

© М. В. Падкина, Е. В. Самбук

Санкт-Петербургский государственный университет

**В обзоре представлены данные об использовании генетически модифицированных микроорганизмов в качестве продуцентов белков разных организмов. Рассмотрены достоинства и недостатки бактериальных и дрожжевых систем экспрессии гетерологичных генов.**

☞ **Ключевые слова:** генетически модифицированные микроорганизмы; экспрессия гетерологичных генов; гетерологичные белки.

## ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ — ПРОДУЦЕНТЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

### ВВЕДЕНИЕ

Достижения молекулярной биологии, генетики микроорганизмов привели к возникновению новой экспериментальной технологии — генетической инженерии. Появилась реальная возможность создания штаммов микроорганизмов с заданными свойствами, что оказало влияние на развитие современной биотехнологии, особенно, направления, связанного с микробиологическим синтезом белков высших эукариотических организмов, получение которых из традиционных источников затруднено. Для того чтобы производство биологически активных соединений микроорганизмами было рентабельным, необходимо использовать высокоэффективные штаммы-продуценты. Создание подобных продуцентов невозможно без знания особенностей организации генома и регуляции метаболизма микробной клетки. Поэтому неслучайно, первым объектом биотехнологии оказались бактерии *Escherichia coli*, у которых детально изучены процессы репликации, транскрипции, трансляции и механизмы регуляции активности генов.

Возможность экспрессии гетерологичных генов в клетках *E. coli* была продемонстрирована более 40 лет назад (Cohen et al., 1973). Вскоре были получены первые штаммы — продуценты соматостатина и инсулина человека (Itakura et al., 1977; Goeddel et al., 1979). Началом эры биофармацевтических препаратов можно считать 1982 год, когда компания «Eli Lilly» (США) начала производство препарата Humulin® (рекомбинантного инсулина человека) (The, 1989).

Сегодня на рынке биофармацевтических препаратов представлены гормоны, интерфероны, интерлейкины, факторы роста, факторы некроза опухоли, факторы свертывания крови, тромболитические препараты, ферменты, моноклональные антитела и вакцины. Рекомбинантные белки используются для лечения, профилактики и диагностики различных заболеваний, в том числе: диабета, рассеянного склероза, гепатитов В и С, анемии, тромбоцитопении, ревматоидного артрита, болезни Крона, злокачественных новообразований и др. (Глумсков, 2007; Ferrer-Miralles et al., 2009; Walsh, 2014).

По данным компании «BCC Research» (США) мировой рынок биофармацевтических препаратов в 2013 г. составил 151,9 миллиарда долларов, в 2014 г. увеличился приблизительно до 157 миллиардов долларов (Global Markets..., 2014).

### БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ

Достоинствами бактериальных систем экспрессии являются широкий выбор штаммов и промоторов для клонирования гетерологичных генов, относительная легкость генно-инженерных манипуляций, высокая скорость роста штаммов-продуцентов на недорогих средах, возможность соблюдения требований GMP (Good Manufacturing Practice) и высокий уровень продукции гетерологичных белков, достигающий 30 % от суммарного белка (Terre, 2006; Demain, Vaishnav, 2009).

Производство интересующего белка в гетерологичном организме является сложным многоступенчатым процессом и включает в себя несколько этапов: клонирование структурного гена в векторе, содержащем промотор и терми-

Поступила в редакцию 09.04.2015  
Принята к публикации 23.04.2015

натор транскрипции, трансформацию и стабильное поддержание гетерологичной ДНК в организме-продуценте; транскрипцию гена и синтез рекомбинантного белка и, наконец, очистку и анализ полученного продукта. Основными факторами, влияющими на уровень продукции гетерологичного белка, являются генотип штамма-продуцента, количество копий клонированного гена, эффективность транскрипции и трансляции, корректность процессинга и фолдинга синтезированного белка, устойчивость его к протеолизу.

Выбор промоторов для экспрессии гетерологичных генов, в первую очередь, обусловлен силой промотора, т.е. его способностью обеспечивать высокий уровень транскрипции. В биотехнологии чаще используют сильные и регулируемые промоторы, что позволяет регулировать экспрессию гетерологичного гена и уменьшать негативные последствия воздействия гетерологичного белка на метаболизм продуцента. Такими промоторами у *E. coli* являются промотор лактозного оперона — *lac*, промотор триптофанового оперона — *trp*, гибридный промотор — *tac*, активность которых регулируется компонентами питательной среды; а также левый и правый промоторы фага  $\lambda$  —  $P_L$  и  $P_R$ , активность которых зависит от температуры (Makrides, 1996; Terpe, 2006). Использование экспрессионных векторов, полученных на основе мультикопийных плазмид и содержащих регулируемые промоторы, как правило, обеспечивает высокий уровень продукции гетерологичного белка без снижения жизнеспособности продуцента (Makrides, 1996).

Эффективность трансляции гетерологичной мРНК зависит от количества редких для *E. coli* кодонов. Недостаток или отсутствие тех или иных тРНК может приводить к замедлению или преждевременной термации трансляции, сдвигу рамки считывания и включению в полипептидную цепь неправильных аминокислот. Для продукции белков, содержащих редкие кодоны, модифицируют последовательность гена или используют штаммы *E. coli*, несущие дополнительные копии необходимых тРНК, или клонируют в других видах бактерий, например, *Bacillus sp.* (Yadava, Ockenhouse, 2003; Terpe, 2006). Повышению эффективности трансляции мРНК может способствовать энхансер трансляции (30 нуклеотидная последовательность гена *atp E. coli*), помещенный перед сайтом связывания рибосом (Makrides, 1996). Увеличение стабильности гетерологичной мРНК, например, за счет включения последовательности 3'UTR гена *cry Bacillus thuringiensis*, повысило выход интерлейкина-2 человека в 4,6–7 раз (Wong, Chang, 1986).

Существенным недостатком системы экспрессии *E. coli* является накопление гетерологичных белков в неактивном состоянии в виде «телец включения» (Thomas et al., 1997). Для перевода агрегированных белков в нативную конформацию требуются дополнительные процедуры, что уменьшает выход целевого белка. Долю агрегированных молекул гетерологичного белка удается снизить, варьируя

компоненты питательной среды, условия культивирования штаммов-продуцентов, обеспечивая сверхпродукцию шаперонов и тиоредоксина (Makrides, 1996). Использование гибридных генов, состоящих из структурного гена гетерологичного белка и структурного гена тиоредоксина *E. coli*, позволило получить интерлейкины ИЛ-2, 4, 5 мыши и ИЛ-3, 6, 11 человека в растворимом состоянии и увеличить выход рекомбинантных белков до 5–20 % от суммарного белка клетки (Demain, Vaishnav, 2009).

Для предотвращения протеолиза гетерологичных белков применяют различные подходы: используют в качестве продуцентов штаммы, лишенные активности протеаз; модифицируют аминокислотную последовательность для удаления потенциальных сайтов расщепления протеазами; оптимизируют условия культивирования (Murby et al., 1996).

Бактерии *E. coli* не способны осуществлять один из основных типов посттрансляционной модификации белковой молекулы у эукариот — гликозилирование. Тем не менее бактериальные клетки используют для продукции гликопротеинов, у которых отсутствие углеводного компонента не влияет на их функцию. Так, биологическая активность рекомбинантного ИЛ-2 человека, полученного из *E. coli* («Пролейкин®»), не отличается от таковой гликозилированного ИЛ-2, выделенного из культуры клеток млекопитающих. Но наличие углеводного компонента повышает растворимость рекомбинантного белка, что имеет большое значение при использовании его в качестве лекарственного средства (Kamionka, 2011). В случае другого гликопротеина человека —  $\beta$ -интерферона (ИФН) — гликан существенно влияет на его стабильность и активность (Dissing-Olesen et al., 2008). Поэтому препараты, содержащие гликозилированный рекомбинантный ИФН- $\beta$  из клеток ооцитов китайского хомячка («Ребиф», «Авонекс») обладают значительно большей биологической активностью по сравнению с препаратами, действующим началом которых является ИФН- $\beta$ , полученный из клеток *E. coli* («Бетаферон») (Kamionka, 2011).

При накоплении гетерологичного белка в цитоплазме *E. coli* не происходит образования дисульфидных связей. Секретия гетерологичного белка в периплазматическое пространство, где работают протеиндисульфидизомеразы семейства Dsb, позволяет частично решить эту проблему. В качестве сигнальных пептидов в основном используют N-концевые последовательности секреторных белков *E. coli* (щелочной фосфатазы, белков внешней мембраны,  $\beta$ -лактамазы, энтеротоксинов), а также других бактерий (белка *A Staphylococcus aureus*, эндогликаназы *Bacillus subtilis*).

В периплазме *E. coli* гетерологичные белки, кроме того, меньше подвергаются протеолитической деградации (Berlec, Strukelj, 2013). Например, секретия проинсулина человека в периплазму повышала время его полужизни в 10 раз (Mergulhao et al., 2005).

Выход гетерологичных эукариотических белков с правильной конформацией, тем не менее относительно низок, что можно объяснить более высокой скоростью синтеза и фолдинга белка у прокариот по сравнению с эукариотами (Widmann, Christen, 2000).

Еще одним обстоятельством, ограничивающим использование *E. coli* для продукции белков эукариот, является пирогенность липополисахаридов их наружной мембраны, известных как эндотоксины, что значительно усложняет процедуру очистки рекомбинантных белков (Terpe, 2006).

Несмотря на отмеченные недостатки, *E. coli* по-прежнему используют для получения гетерологичных белков (табл. 1), основную часть которых составляют белки человека, используемые в качестве лекарственных и профилактических препаратов — гормоны (инсулин, инсулиноподобный фактор роста — IGF1, гормон роста, эритропоэтин); факторы роста (колониестимулирующий фактор — CSF, фактор роста кератиноцитов — KGF), цитокины (ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\beta$ , ИФН- $\gamma$ ; ИЛ-1, ИЛ-6; фактор некроза опухоли — TNF), ферменты и их ингибиторы и др. (Kamionka 2011; Kyriakopoulos, Kontoravdi, 2013).

На фармацевтическом рынке России преобладают импортные биофармацевтические препараты. Тем не менее в последние годы в России организовано производство препаратов на основе рекомбинантных белков человека, полученных из клеток *E. coli*. Среди отечественных препаратов преобладает ИФН- $\alpha$ , который применяют для лечения вирусных заболеваний. Кроме того, производятся ИФН- $\beta$ , составляющий основу терапии больных рассеянным склерозом; и гормоны — инсулин, соматотропин, эритропоэтин (Обзор рынка биотехнологий..., 2014).

Бактерии *E. coli* не являются единственными представителями прокариотических микроорганизмов, используемых для продукции гетерологичных белков. В качестве альтернативы можно рассматривать грамм-положительные бактерии рода *Bacillus*, включая *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, преимуществом которых являются отсутствие пирогенных липополисахаридов во внешней мембране, что позволило присвоить им статус GRAS (generally recognized as safe) (Westers et al., 2004; Liu et al., 2013).

Ранее *Bacillus sp.* успешно применяли для промышленного производства бактериальных ферментов, используемых в промышленности: щелочных протеаз, входящих в состав моющих средств, и амилаз для получения крахмала (Westers et al., 2004). За счет увеличения дозы генов определенных метаболических путей получены штаммы-продуценты биологически активных веществ небелковой природы: поли- $\gamma$ -глутаминовой кислоты, используемой в пищевой и косметической промышленности; биodeградируемых поверхностно-активных соединений; рибофлавина и пр. (Liu et al., 2013). В настоящее время *Bacillus sp.* начинают все более актив-

но использовать для продукции гетерологичных белков различного происхождения. Этому способствовало секвенирование генома *B. subtilis*, разработка эффективных методов трансформации, а также конструирование векторов экспрессии с сильными регулируемыми промоторами (Liu et al., 2013). Наиболее перспективными промоторами для экспрессии гетерологичных генов являются промотор гена *cry*, который активируется в стационарной фазе роста культуры; промоторы ксилозного и мальтозного оперонов — *xyI* и *mal*, активность которых регулируется при помощи катаболитной репрессии (Westers et al., 2004; Terpe, 2006; Liu et al., 2013).

Как уже упоминалось, скорость и качество трансляции гетерологичной мРНК зависят от количества редких для организма-продуцента кодонов. По сравнению с *E. coli*, частота использования определенных изоакцепторных кодонов *Bacillus sp.* более оптимальна для продукции белков эукариотических организмов (Terpe, 2006). На эффективность трансляции также может влиять функциональное состояние рибосомы. Мутация в гене *rpsL*, кодирующем белок S12 30S субъединицы, повышала стабильность 70S рибосомы и увеличивала выход  $\alpha$ -амилазы (Kurosawa et al., 2006).

Немаловажным достоинством *Bacillus sp.* является высокий уровень секреции белков в культуральную среду, который для собственных белков может достигать 20–25 г/л (Liu et al., 2013). Продукция гетерологичных белков значительно ниже. Учитывая, что секреция белка упрощает его последующую очистку, проводится изучение механизмов секреции, регуляции этого процесса, определяются наиболее эффективные сигнальные последовательности. Результаты исследований позволили повысить секрецию гетерологичных белков, например, ИФН- $\alpha$  человека, в 2 раза (Westers et al., 2004; Liu et al., 2013).

В зависимости от механизма секреции белки попадают в культуральную среду в свернутом состоянии (ТАТ-путь) или приобретают нативную конформацию после выхода на поверхность клетки (SEC-путь). Здесь же происходит образование дисульфидных связей (Westers et al., 2004). При высоком уровне секреции часть молекул гетерологичного белка может иметь неправильную конформацию. Коэкспрессия шаперонов, особенно шаперона PrsA, связанного с внешней стороной клеточной мембраны, примерно в 2,5 раза увеличивала продукцию антифибрина и антидигоксина с правильной конформацией (Westers et al., 2004).

Выход секретлируемых гетерологичных белков зависит от активности экстраклеточных протеаз *Bacillus sp.* Первоначально в качестве продуцентов чаще использовали клетки *B. brevis*, которые характеризуются низкой активностью протеаз (Terpe, 2006). В дальнейшем были изучены свойства экстраклеточных протеаз, определены их структурные гены, исследовано влияние отсутствия тех или иных ферментов на жизнеспособ-

ность бактерий, что позволило получить мутантные штаммы, лишенные активности 8 экстраклеточных протеаз. На основе этих мутантов были получены штаммы-продуценты, секретирующие от 1 до 3 г/л рекомбинантных белков — проинсулина и протеиндисульфидизомеразы человека; холерного токсина; бактериальной  $\alpha$ -амилазы (Westers et al., 2004; Terpe, 2006). Список гетерологичных белков, синтезируемых *Bacillus sp.*, постоянно растет и включает белки разных организмов (табл. 1), в том числе, ИФН- $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-6, проинсулин, EGF человека, мышинный EGF, бактериальные и растительные фибринолитические протеазы, а также бактериальные  $\alpha$ -амилазы, ксиланазы, липазы, карбоксиметилцеллюлазы (Westers et al., 2004; Terpe, 2006; Liu et al., 2013). Тем не менее ни один штамм-продуцент на основе *Bacillus sp.* пока не используется для промышленного производства рекомбинантных белков. Одной из причин этого, воз-

можно, является необходимость значительных финансовых вложений для создания новых технологических регламентов и линий.

Таким образом, прокариотические организмы могут быть использованы и используются для продукции гетерологичных белков. Около 30 % биофармацевтических препаратов, выпускаемых международными фармацевтическими компаниями, содержат в качестве действующего начала рекомбинантные белки бактериального происхождения (Ferrer-Miralles et al., 2009). В то же время, следует заметить, что бактериальные продуценты не способны синтезировать аутентичные эукариотические белки, требующие посттрансляционных модификаций.

Проблему синтеза гетерологичных гликопротеинов может решить использование клеток млекопитающих. Существенным недостатком этих систем экспрессии является сложность работы с культурами клеток, доро-

Таблица 1

## Рекомбинантные белки медицинского назначения, синтезируемые микроорганизмами

Продукт	Область применения <sup>5</sup>	Организм-продуцент
Инсулин	Диабет	<i>E. coli</i> <sup>1,2</sup> , <i>S. cerevisiae</i> <sup>1</sup>
Глюкагон	Гипогликемия	<i>S. cerevisiae</i> <sup>1</sup>
Инсулиноподобный фактор роста	Нарушения роста у детей и подростков	<i>E. coli</i> <sup>1</sup> , <i>P. pastoris</i> <sup>3</sup>
Гормон роста		<i>E. coli</i> <sup>1,2</sup>
Эритропоэтин	Анемия	<i>E. coli</i> <sup>1,2</sup> , <i>P. pastoris</i> <sup>3</sup>
Колонистимулирующий фактор	Нейтропения	<i>P. pastoris</i> <sup>3</sup>
Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор		<i>S. cerevisiae</i> <sup>1</sup>
Фактор роста тромбоцитов	Тромбоцитопения	<i>S. cerevisiae</i> <sup>1</sup>
Фактор роста кератиноцитов	Заживление ран	<i>P. pastoris</i> <sup>3</sup>
Эпидермальный фактор роста		<i>P. pastoris</i> <sup>3</sup> , <i>Bacillus sp.</i> <sup>3</sup>
Гирудин	Профилактика и лечение тромбозов	<i>S. cerevisiae</i> <sup>1</sup>
ИФН- $\alpha$	Вирусные инфекции, онкология	<i>E. coli</i> <sup>1,2</sup> , <i>P. pastoris</i> <sup>4</sup> , <i>Bacillus sp.</i> <sup>3</sup>
ИФН- $\beta$	Рассеянный склероз	<i>E. coli</i> <sup>1,2</sup> , <i>P. pastoris</i> <sup>4</sup>
ИФН- $\gamma$	Вирусные инфекции	<i>E. coli</i> <sup>1</sup> , <i>P. pastoris</i> <sup>4</sup>
ИЛ-1	Иммуномодуляция	<i>E. coli</i> <sup>1,2</sup>
ИЛ-2	Иммуномодуляция, онкология, вирусные инфекции	<i>E. coli</i> <sup>1</sup> , <i>S. cerevisiae</i> <sup>2</sup> , <i>P. pastoris</i> <sup>4</sup> , <i>Bacillus sp.</i> <sup>4</sup>
Фактор некроза опухоли	Онкология	<i>E. coli</i> <sup>1,2</sup>
Поверхностный антиген вируса гепатита В	Получение вакцины	<i>S. cerevisiae</i> <sup>1</sup> , <i>P. pastoris</i> <sup>1</sup>
Поверхностный антиген вируса папилломы		<i>S. cerevisiae</i> <sup>1</sup>
Ингибитор калликрина	Наследственный ангионевротический отек	<i>P. pastoris</i> <sup>1</sup>
Ангиостатин	Подавление ангиогенеза	<i>P. pastoris</i> <sup>3</sup>
Эндостатин		<i>P. pastoris</i> <sup>3</sup>
Ингибитор эластазы	Эмфизема легких	<i>P. pastoris</i> <sup>3</sup>
Сывороточный альбумин	Заменитель плазмы крови	<i>P. pastoris</i> <sup>3</sup>

<sup>1</sup> — производство за рубежом; <sup>2</sup> — производство в России; <sup>3</sup> — стадия разработки за рубежом; <sup>4</sup> — стадия разработки в России; <sup>5</sup> — согласно данным, приведенным в статье (Симбирцев, 2013)

гостоящие среды и относительно низкий выход продукта (Demain, Vaishnav, 2009; Bandaranayake, Almo, 2013; Berlec, Strukelj, 2013).

Компромиссным решением является использование системы экспрессии дрожжей. Дрожжи являются эукариотическими микроорганизмами, поэтому способны обеспечивать корректную посттрансляционную модификацию белков человека и животных (Eckart, Bussineau, 1996). У дрожжей подробно изучены механизмы регуляции матричных процессов и метаболизма, при работе с ними используются стандартные методы генной инженерии, дрожжи легко культивировать на относительно дешевых субстратах. Длительный опыт использования дрожжей, свидетельствующий об их непатогенности, позволил присвоить им статус GRAS (Berlec, Strukelj, 2013). Применение системы экспрессии дрожжей позволяет сочетать простоту бактериальных систем экспрессии и качество белка, получаемое в культуре клеток млекопитающих.

#### СИСТЕМА ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Начиная с начала 1980-х годов, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* успешно используют для продукции белков человека, животных, растений, особенно таких, которые трудно выделить в значительных количествах из традиционных источников (Romanos et al., 1992). Выбор именно этого вида дрожжей обусловлен тем, что они являются модельным объектом молекулярной генетики и вследствие этого прекрасно изучены.

Для клонирования гетерологичных генов в дрожжах используют мультикопийные или интегративные плазмиды. В состав мультикопийных плазмид входит фрагмент нативной плазмиды дрожжей, 2 мкм ДНК, который и обеспечивает репликацию плазмиды. При помощи генетической инженерии сконструированы плазмиды, количество копий которых в клетке может достигать 200–400 (Erhart, Hollenberg, 1983). Интегративные плазмиды, содержащие последовательности гена рибосомной РНК или Ту-транспозона, которые присутствуют в геноме дрожжей в количестве 140 и 30–40 копий, соответственно, позволяет получать множественные встройки гетерологичного гена. Уровень продукции гетерологичного белка в этом случае может быть выше, чем у трансформантов с мультикопийными плаزمидами (Lopes et al., 1989; Lee, Silva, 1996).

Первые опыты по экспрессии гетерологичных генов в дрожжах показали, что эффективная экспрессия возможна только при наличии в составе вектора регуляторных последовательностей генов дрожжей, которые будут узнаваться ферментными системами клетки хозяина. Попытки использовать собственные промоторы для экспрессии чужеродных генов в дрожжах были неудачными.

#### Промоторы генов дрожжей *S. cerevisiae*, используемые в биотехнологии

У дрожжей *S. cerevisiae* наиболее сильными являются промоторы генов, кодирующих структуру ферментов гликолиза. Это связано с тем, что основным путем катаболизма сахаров у дрожжей является гликолиз, в результате которого глюкозо-6-фосфат или фруктозо-6-фосфат превращаются в пируват. Дальнейшее превращение пирувата зависит от условий культивирования и вида дрожжей. У дрожжей *S. cerevisiae*, которые являются факультативными анаэробами, независимо от условий выращивания утилизация сахаров происходит в результате брожения (Johnston, Carlson, 1992).

Для гетерологичной экспрессии в клетках дрожжей чаще всего используют промоторы структурных генов алкогольдегидрогеназы — *ADH1*; основного изоэнома глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы — *GPD3* (*TDH3*); 3-фосфоглицераткиназы — *PGK1*, триозофосфатизомеразы — *TPH1*.

Первым примером удачного использования в биотехнологии промоторов генов, кодирующих ферменты гликолиза, было клонирование гена ИФН- $\alpha$  человека под контролем *ADH1* промотора. Рекомбинантные дрожжи синтезировали биологически активный ИФН- $\alpha$ , содержание которого составляло 1–2% от суммарного белка (Hitzeman et al., 1981). Аналогичные результаты были получены при использовании *GPD3* промотора (Bitter, Egan, 1984).

Экспрессия гена *S*, кодирующего поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), продемонстрировала принципиальную возможность получения рекомбинантных субъединичных вакцин в дрожжах. Количество рекомбинантного белка варьировало от 1–2% (при использовании *ADH1* и *PGK1* промоторов) до 2–4% (при использовании *GPD3* промотора) (Valenzuela et al., 1982; Hitzeman et al., 1983; Bitter, Egan, 1984). При этом HBsAg присутствовал в виде липопротеидных агрегатов, похожих на комплексы, которые образуются в клетках млекопитающих, и давал положительную реакцию со специфическими антителами (Hitzeman et al., 1983).

В 1986 г. был получен штамм-продуцент предшественника инсулина человека, в котором экспрессию гетерологичного гена контролировал *TPH1* промотор. Клетки дрожжей синтезировали и секретировали одну полипептидную цепь, содержащую А, В субъединицы инсулина и про-пептид С, который удаляли *in vitro* при помощи трипсина и карбоксипептидазы В (Thim et al., 1986). Вскоре компания «NovoNordisk» начинает промышленное производство инсулина человека (Bill, 2014).

Несмотря на примеры удачного использования промоторов гликолитических генов для экспрессии гетерологичных генов, их применение в биотехнологии ограничено. Существенным недостатком этих промоторов является постоянно высокий уровень транскрипции генов, находящихся под их контролем (Moore et al., 1991).

Это сопровождается повышением концентрации гетерологического белка в клетке и может оказывать отрицательное влияние на метаболизм, скорость роста и жизнеспособность клеток дрожжей. Селективное преимущество будут получать клетки, содержащие меньшее количество копий рекомбинантной плазмиды, что приведет к снижению продуктивности штаммов (Nopaka et al., 2000). Поэтому более перспективным является использование регулируемой экспрессии гетерологических генов. При таком подходе удается разделить стадии роста штамма-продуцента и синтеза чужеродного белка и, таким образом, снизить метаболическую нагрузку на клетки дрожжей.

Для экспрессии гетерологических генов чаще всего используют промоторы генов, контролирующих метаболизм галактозы или фосфата.

В утилизации галактозы принимают участие продукты многих генов, экспрессия которых в разной степени репрессируется глюкозой и индуцируется галактозой. Уровень транскрипции генов *GAL1*, *GAL7*, *GAL10* в присутствии галактозы повышается в 1000 раз. В регуляции экспрессии *GAL*-генов принимают участие белок активатор Gal4p и белок репрессор Gal80p. Количество Gal4p в клетке дрожжей крайне мало (около 160 молекул на клетку) (Johnston, Carlson, 1992). Сайты связывания белка активатора в промоторах генов *GAL1*, *GAL7*, *GAL10* расположены на участках, свободных от нуклеосом, что облегчает связывание Gal4p и способствует быстрой индукции экспрессии регулируемых генов (Lohr, 1997).

Выяснение механизмов регуляции экспрессии *GAL*-генов позволяет использовать различные подходы для создания эффективных штаммов-продуцентов гетерологических белков. Фактором, лимитирующим уровень экспрессии гетерологического гена, клонированного под контролем промотора *GAL*-генов, может оказаться низкое содержание Gal4p в клетке дрожжей.

Одним из способов повышения концентрации белка активатора является увеличение дозы гена *GAL4*. Одновременное клонирование в мультикопийной плазмиде гена *GAL4* и гена *lacZ* *E. coli* под контролем промотора гена *GAL1* увеличивало продукцию β-галактозидазы в 10 раз, но при этом нарушалась регуляция, и рекомбинантный белок синтезировался на среде с глюкозой (Poggo et al., 1992). В то же время клонирование гена *GAL4* и гена *gp350* вируса Эпштейна–Барра под контролем *GAL10* промотора позволило сохранить регуляцию транскрипции и повысить синтез соответствующего белка в 10 раз (Schultz et al., 1987).

Тем не менее штаммы с суперпродукцией Gal4p редко используют в качестве продуцентов гетерологических белков. Это связано с многочисленными побочными эффектами: снижением скорости роста, нарушением целостности цитоплазматической мембраны (Martegani et al., 1993).

Строгая регуляция транскрипции *GAL*-генов, а также быстрая и эффективная индукция их экспрессии делают промоторы этих генов одними из наиболее часто исполь-

зуемых регулируемых промоторов для экспрессии гетерологических генов в дрожжах. Не менее популярным является промотор гена *PHO5* — структурного гена кислой фосфатазы 2 дрожжей.

Кислая фосфатаза 2 — основной изотим репрессивной кислой фосфатазы дрожжей. Экспрессия гена *PHO5* происходит только в отсутствие неорганического фосфата и регулируется на уровне транскрипции факторами позитивного и негативного контроля (Toh-e et al., 1975; Кожин и др., 1986). К позитивным регуляторам относятся белки, кодируемые генами *PHO2*, *PHO4*, *PHO81* (Oshima, 1982; Самбук и др., 1988), негативными регуляторами являются белки, структуру которых определяют гены *PHO80* и *PHO85* (Ueda et al., 1975). Один из сайтов связывания основного белка активатора Pho4p в промоторе гена *PHO5* находится в межнуклеосомном участке (Lohr, 1997). В условиях дерепрессии Pho4p связывается с этим сайтом, обеспечивает сдвиг нуклеосом и открывает дополнительный сайт связывания для Pho4p, а также для Pho2p (Svaren, Horz, 1997). Присоединение белков активаторов инициирует транскрипцию гена *PHO5*.

Одним из первых примеров применения промотора *PHO5* в биотехнологии было клонирование гена *S*, кодирующего структуру HBsAg. Уровень продукции рекомбинантного белка и HBsAg частиц практически не отличался от того, что наблюдали при клонировании гена *S* под контролем сильных промоторов гликолитических генов, и составлял 4 % и 0,02 % суммарного клеточного белка, соответственно (Miyanohara et al., 1983).

Определенным недостатком данной системы экспрессии является необходимость использования сред с низким содержанием неорганического фосфата для индукции транскрипции гена *PHO5*, а также всех генов, находящихся под контролем этого промотора. Известно, что снижение концентрации неорганического фосфата в среде сопровождается активизацией процесса брожения, приводит к быстрому накоплению этилового спирта, уменьшению клеточной биомассы и, соответственно, выхода рекомбинантного белка (Zurbriggen et al., 1989).

Сложная многоступенчатая система регуляции экспрессии гена *PHO5*, казалось бы, открывает возможность целенаправленного изменения штаммов-продуцентов гетерологических белков, но, как и в случае *GAL*-системы экспрессии, возможности усовершенствования штаммов-продуцентов за счет изменения регуляции транскрипции гена *PHO5* весьма ограничены. Использование мутантов *pho80* и *pho85* в качестве штаммов-продуцентов не приводило к желаемому результату, т.к. конститутивная экспрессия гетерологического гена и индукция синтеза белка отрицательно сказывалась на жизнедеятельности дрожжевой клетки (Miyanohara et al., 1983).

При увеличении количества Pho4p синтез основного белка р24 вируса лейкемии крупного рогатого скота (BLV) становился конститутивным, происходило сниже-

ние скорости роста штаммов-продуцентов и уменьшение выхода гетерологичного белка (Dumont et al., 1989).

Несмотря на отмеченные недостатки, примеры использования *PHO5* промотора в биотехнологии достаточно многочисленны.

Так, под контролем *PHO5* промотора были клонированы гены, кодирующие цитокины человека и животных: ИФН- $\alpha$ 1, ИФН- $\alpha$ 2, ИФН- $\alpha$ 16 (Kramer et al., 1984; Schaber et al., 1986; Мясников и др., 1988 б), ИФН- $\beta$  (Падкина и др., 1998), ИЛ-2 человека (Мясников и др., 1988 а), ИФН- $\gamma$  быка (Мясников и др., 1989). Во всех случаях клетки дрожжей синтезировали биологически активные белки. Уровень продукции зависел от конкретного белка и варьировал от 1 мг ИФН- $\beta$  до 30 мг интерлейкина-2 человека на литр культуральной жидкости.

Эффективность экспрессии гетерологичного гена в клетках дрожжей также зависит от терминатора, который необходим для корректного процессирования матричной РНК, включающего терминацию транскрипции и полиаденилирование. Нуклеотидные последовательности, отвечающие за формирование 3'-конца матричной РНК у дрожжей, менее консервативны по сравнению с высшими эукариотами (Guo, Sherman, 1995). Общей чертой этих нетранслируемых последовательностей является высокое содержание АТ-нуклеотидов. Несмотря на то, что в терминаторе дрожжей есть последовательность, совпадающая с консервативным сигналом полиаденилирования млекопитающих, а сайты присоединения поли-(А)-последовательности одинаковы, дрожжи не способны узнавать сигналы полиаденилирования высших эукариот, и терминаторы высших эукариот, как правило, не функционируют в клетке дрожжей (Trachtulec, Forejt, 1999). Поэтому для обеспечения нормальной терминации транскрипции гетерологичных генов используют терминаторы генов дрожжей.

Известно, что большинство генов высших эукариотических организмов содержат интроны. Интроны обнаружены и в генах дрожжей, тем не менее дрожжи не способны обеспечить корректный сплайсинг гетерологичной эукариотической мРНК, поэтому для клонирования в дрожжах используют кДНК копии (Trachtulec, Forejt, 1999).

### **Синтез гетерологичных белков**

Элонгация трансляции может оказаться лимитирующей стадией при синтезе гетерологичного белка, если мРНК содержит много редких для дрожжей кодонов аминокислот. Предпочтительное использование определенных триплетов определяется уровнем соответствующих тРНК и аминоацил-тРНК-синтетаз. При отсутствии или недостатке определенных изо-акцепторных тРНК происходит замедление трансляции, возможно встраивание ошибочных аминокислот и преждевременная терминация (Eckart, Bussineau, 1996). В результате будет

снижаться уровень продукции гетерологичного белка и/или будут синтезироваться измененные молекулы (мутеины). Мутеины могут быть иммуногенны, поэтому их присутствие нежелательно в препаратах медицинского назначения. Для решения этой проблемы можно модифицировать чужеродный ген таким образом, чтобы он не содержал редких для дрожжей кодонов. Именно такой подход использовали для продукции в клетках дрожжей протеазы возбудителя малярии *Plasmodium falciparum* (Withers-Martinez et al., 1999; Yadava, Ockenhouse, 2003) и белков пшеницы P450 и P450-редуктазы, определяющих ее устойчивость к гербицидам (Batard, 2000). В то же время, существуют примеры высокого уровня продукции гетерологичных белков, транскрипты которых содержат редкие для дрожжей кодоны аминокислот. В первую очередь следует отметить супероксиддисмутазу человека. Более того, за счет слияния ее кДНК с другим клонируемым геном удавалось увеличить выход интересующего гетерологичного белка. В виде таких гибридных белков в дрожжах были успешно синтезированы проинсулин человека (Cousens et al., 1987) и белки оболочки вируса иммунодефицита (HIV) (Barr et al., 1987).

Основная масса гетерологичных белков накапливается в клетках дрожжей, как и в клетках бактерий, в виде «телец включения» (Cousens et al., 1987; Thomas et al., 1997). Одной из основных причин образования подобных агрегатов, по-видимому, является недостаток соответствующих шаперонов. Дефицит шаперонов при гетерологичной экспрессии может быть обусловлен как высокой скоростью синтеза гетерологичного белка, так и более продолжительным временем его фолдинга, что приводит, в свою очередь, к уменьшению пула шаперонов, способных выполнять свои функции. Действительно, уровень продукции люциферазы и GFP (green fluorescent protein) в дрожжах строго зависел от Ydj1p, одного из Hsp40p. Отсутствие этого шаперона приводило к резкому снижению эффективности трансляции гетерологичной мРНК (Brodsky et al., 1998). Примеры положительного влияния увеличения концентрации Hsp70 на выход гетерологичных белков у дрожжей показаны, в основном, для секреторных продуктов (Sudbery, 1996).

Использование в качестве продуцентов гетерологичных белков штаммов дрожжей с суперпродукцией тех или иных шаперонов не всегда приводит к желаемому результату. Суперпродукция белков теплового шока имитирует реакцию клетки на определенные стрессорные факторы — повышение температуры, увеличение концентрации активных радикалов кислорода, голодание — и может сопровождаться снижением уровня экспрессии генов, кодирующих белки рибосом и шаперонов Ssb1 и Ssb2 (Lopez et al., 1999).

Одним из основных факторов, определяющих уровень продукции рекомбинантных белков, является их стабильность или устойчивость к деградации. Стабильность гетерологичных белков можно повысить, если экс-

прессировать их в виде гибридных молекул, в которых интересующий полипептид слит с супероксиддисмутазой (Cousens et al., 1987; Bagt et al., 1987) или с убиквитином (Sabin et al., 1989).

В деградации гетерологичных белков могут участвовать вакуолярные протеазы, а секретируемые белки могут расщепляться также протеазами эндоплазматического ретикулума (ЭР), участвующими в процессинге белков, и экстраклеточными протеазами.

Использование *per4-3* мутантов дрожжей, лишенных активности вакуолярных протеаз, увеличивало продукцию фактора роста фибробластов и IGF1 человека (Bagt et al., 1988; Bayne et al., 1988). Предотвратить фрагментацию секретируемых  $\beta$ -эндорфина, ИФН- $\alpha$ , паратиреоидного гормона, альбумина человека и ряда других белков удалось только при использовании в качестве штаммов-продуцентов мутантов, у которых отсутствовали протеазы аппарата Гольджи (АГ) — Kex2p и/или Yarp3p (Kang et al., 1998; Kerry-Williams et al., 1998).

### Секреция гетерологичных белков

Секреция гетерологичных белков в культуральную среду имеет определенные преимущества по сравнению с внутриклеточной продукцией. В процессе секреции образуются дисульфидные связи, которые стабилизируют третичную структуру белка, а также происходят посттрансляционные модификации, необходимые для функциональной активности многих гетерологичных белков. Кроме того, секреция гетерологичного белка значительно упрощает его очистку, а также позволяет избежать возможного токсичного влияния продукта на клетку дрожжей.

Структура и функции секреторного аппарата дрожжей и млекопитающих практически не отличаются, поэтому дрожжи могут синтезировать секреторные белки человека (FV фрагмент моноклональных антител, рецептор эритропоэтина, тромбомодулин, липазу, коллагеназу фибробластов, интерлейкин 8 и пр.). В качестве сигнальных последовательностей чаще всего используют преполипептид  $\alpha$ -фактора (MFa1) дрожжей (Idiris et al., 2010).

### Фолдинг секреторных белков

В формировании нативной структуры белка в полости ЭР принимают участие шапероны ЭР и фольдазы, в частности, ферменты, катализирующие образование дисульфидных связей. У дрожжей шаперон Kar2p, локализованный на внутренней стороне мембраны, способствует транслокации полипептидной цепи в полость ЭР и обеспечивает фолдинг белковой молекулы (Zarup et al., 1999). Образование дисульфидных связей, которое катализирует протеиндисульфидизомераза (Pdi1p), является важнейшим этапом процессирования секреторных белков в ЭР (Zarup et al., 1999).

Клетки дрожжей содержат все вспомогательные белки, необходимые для обеспечения нативной конформации гетерологичных секреторных белков. Но при супер-

продукции гетерологичного белка шапероны и фольдазы могут не справиться со своими функциями, что приводит к появлению в ЭР агрегатов несвернутого белка, которые переносятся в цитоплазму и расщепляются в протеасоме. Очевидно, что гетерологичные белки конкурируют с белками дрожжей за связывание с шаперонами и ферментами ЭР, и суперпродукция рекомбинантного белка может отрицательно сказываться на секреции дрожжевых белков.

Для повышения уровня белков ЭР, участвующих в фолдинге, можно клонировать соответствующие структурные гены в составе мультикопийных плазмид под контролем сильных промоторов. Увеличение числа копий гена *KAR2* восстанавливало рост дрожжей-суперпродуцентов протеиназы *Rhizopus niveus* (Umebayashi et al., 1999), повышало выход прохимозина быка (Harmsen et al., 1996), гирудина (Kim et al., 2003), глюкозидазы *Pyrococcus sp.* (Smith et al., 2004), но, в то же время, не влияло на секрецию растительного белка тауматина (Harmsen et al., 1996), CSF 3 человека, ингибитора трипсина быка, кислой фосфатазы *Schizosaccharomyces pombe* (Robinson et al., 1994). Одновременная сверхпродукция Kar2p и кошаперонов семейства Hsp40 повышала уровень продукции альбумина и трансферина человека (Payne et al., 2008). При сверхпродукции Pdi1p клетки дрожжей более эффективно секретируют белки с дисульфидными связями, так и без них (Hou J. et al., 2012). Эти данные свидетельствуют о том, что уровень секреции в большей степени зависит от свойств гетерологичного белка.

### Гликозилирование секретируемых белков

В процессе секреции происходит наиболее сложная модификация белков — гликозилирование. Ковалентное присоединение олигосахаридов к полипептидной цепи имеет значение для фолдинга белка и стабилизации его структуры. Углеводный компонент играет важную роль в функционировании гликопротеинов и оказывается вовлеченным в процессы связывания гормонов с рецепторами, антител с антигенами, в опознавание клеточных рецепторов и межклеточный сигналинг, во взаимодействие различных микроорганизмов с клеткой хозяина (Imperiali, O'Connell, 1999). Существует два типа гликозилирования белков: N-гликозилирование, при котором присоединение углеводных остатков происходит к аспарагину, и O-гликозилирование, когда углеводные остатки прикрепляются к серину или треонину.

Первые этапы N-гликозилирования, протекающие на мембране и в полости ЭР, не отличаются у дрожжей и млекопитающих и заканчиваются формированием корового олигосахарида, состоящего из 2 остатков N-ацетилглюкозамина и 9 остатков маннозы. Однако изменения структуры углеводного компонента гликопротеинов, которые происходят в АГ, существенно различаются

у разных организмов. У млекопитающих часть манноз удаляется или замещается галактозой, фукозой, сиаловой кислотой. У дрожжей *S. cerevisiae* синтезируется маннан с разветвленной внешней цепью, включающей до 200 маннозных остатков. Структура олигосахарида при O-гликозилировании белков у дрожжей и млекопитающих также отличается (De Roucq et al., 2010).

Гетерологичные гликопротеины, секретруемые дрожжами *S. cerevisiae*, содержат ковалентно связанные олигосахариды, типичные для дрожжей (De Roucq et al., 2010). Гипергликозилирование, не характерное для белков млекопитающих, может приводить к изменению свойств рекомбинантного белка, ингибировать взаимодействие цитокинов и гормонов с рецепторами, антигена с антителами (Eckart, Bussineau, 1996). Подобные рекомбинантные гликопротеины быстро нейтрализуются маннозными рецепторами макрофагов. Кроме того, эти белки оказываются иммуногенными из-за присутствия терминальных  $\alpha$ 1,3-связанных маннозных остатков (Ballou, 1970). Все это ограничивает возможность использования белков, секретруемых дрожжами *S. cerevisiae*, в качестве лекарственных препаратов.

Проблемы, связанные с гипергликозилированием гетерологичных белков, пытаются решать несколькими способами: ингибируют синтез олигосахаридных предшественников; используют мутанты дрожжей, у которых нарушены отдельные этапы биосинтеза углеводного компонента; удаляют сайты гликозилирования в молекуле белка.

Ингибирование синтеза олигосахаридных предшественников приводит к прекращению N-гликозилирования не только гетерологичных, но и белков дрожжей, что сопровождается неправильным фолдингом собственных секреторных белков, накоплением их агрегатов в ЭР и снижением жизнеспособности штаммов-продуцентов. Мутации, затрагивающие первые этапы синтеза олигосахарида, приводят к замедленному росту штаммов (Romanos et al., 1992). Для удаления потенциальных сайтов гликозилирования необходимо вносить изменения в аминокислотную последовательность белка, что будет влиять на свойства и качество получаемого рекомбинантного белка. В последние годы предпринимаются попытки получения штаммов дрожжей, которые способны синтезировать олигосахариды, свойственные гликопротеинам млекопитающих. Для этого часть генов дрожжей, контролирующая гликозилирование белков, замещают генами других организмов (Chiba, Akeboshi, 2009).

Гипергликозилирование — не единственный недостаток дрожжей *S. cerevisiae* как продуцентов гетерологичных белков. У дрожжей-сахаромицетов отсутствуют сильные промоторы, способные обеспечить уровень продукции рекомбинантных белков, сопоставимый с бактериальными системами экспрессии. Рост этих дрожжей, как и синтез гетерологичных белков, блокируется эта-

нолом, продуктом ферментации глюкозы, что является одной из причин относительно низкого выхода продукта (Sudbery, 1996). Тем не менее дрожжи *S. cerevisiae* являются продуцентами 20 % биофармацевтических препаратов, действующим началом которых служат белки человека (табл. 1), среди которых гормоны — инсулин, глюкагон; факторы роста — гранулоцитарно-макрофагальный колоннестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор роста тромбоцитов (PDGF); антикоагулянты — гирудин; поверхностные антигены вируса гепатита В и вируса папилломы; цитокины — ИЛ-2; ферменты — супероксиддисмутаза, уратоксидаза и др. (Celik, Calik, 2012; Hou et al., 2012).

В России производится только 2 препарата: Ронколейкин (ИЛ-2 человека), применяемый для лечения септических состояний, ряда онкологических и инфекционных заболеваний, и Рексод-ОФ (супероксиддисмутаза), используемый для удаления свободных радикалов кислорода (Обзор рынка биотехнологий..., 2014).

Широкий выбор дрожжевых систем для экспрессии гетерологичных генов позволяет избавиться от основных недостатков, характерных для дрожжей-сахаромицетов. Наиболее популярным объектом биотехнологии в настоящее время являются дрожжи *Pichia pastoris* (Cereghino, Cregg, 2000; Gasser et al., 2013).

#### СИСТЕМА ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *PICHA PASTORIS*

Дрожжи *P. pastoris* принадлежат к метилотрофным дрожжам, способным использовать метанол в качестве единственного источника углерода и энергии. В отличие от дрожжей *S. cerevisiae*, *P. pastoris* являются аэробными организмами, в процессе утилизации источников углерода у них не образуется этанол, не происходит ингибирования роста культуры. Дрожжи *P. pastoris* сразу привлекли внимание биотехнологов в качестве возможного источника относительно недорогого кормового белка. В связи с этим были разработаны специальные среды и технологии длительного культивирования этих дрожжей, позволяющие получать более 130 граммов сухой биомассы из литра культуральной среды, что существенно превышает возможности дрожжей *S. cerevisiae* и в значительной мере определяет высокий уровень продукции гетерологичных белков (Cereghino, Cregg, 2000).

#### Промоторы генов дрожжей *P. pastoris*, используемые в биотехнологии

Уровень синтеза ферментов метаболизма метанола у дрожжей *P. pastoris* регулируется источником углерода и достигает максимальных значений только в присутствии метанола. Эта зависимость особенно сильно выражена у первого фермента — алкогольоксидазы 1,

которая отсутствует на среде без метанола, а при индукции составляет до 30 % суммарного клеточного белка (Couderc, Varatti, 1980). В регуляции транскрипции гена *AOX1* и других генов пути утилизации метанола принимает участие белок Mxg1p. У штаммов с делецией или мутацией гена *MXR1* экспрессия генов катаболизма метанола заметно снижена или отсутствует (Lin-Cereghino et al., 2006). Недавно получены данные о влиянии источника азота и неорганического фосфата на уровень экспрессии гена *AOX1* и об участии в этом процессе протеинкиназ Тог-комплекса и Pho85p (Румянцев и др., 2013; Rumjantsev et al., 2014). Это обеспечивает возможность более тонкой регуляции экспрессии гетерологичных генов, клонированных под контролем *AOX1* промотора. Именно строгая регуляция транскрипции гена *AOX1*, а также сила *AOX1* промотора, сопоставимая с промоторами бактериальных генов, обусловили использование данного промотора в биотехнологии. К настоящему времени под контролем *AOX1* промотора проклонировано более 500 генов разных организмов (Macauley-Patrick et al., 2005).

Следует заметить, что использование *AOX1* промотора в биотехнологии имеет свои недостатки. В первую очередь, это связано с природой индуктора — метанола, который является легко воспламеняющимся и токсичным соединением. В качестве альтернативных промоторов для клонирования гетерологичных генов предлагается использовать регулируемые промоторы *FLD1*, *PHO89*, а также конститутивные промоторы *GAP*, *PEX8*, *YPT1* и др. (Vogl, Glieder, 2013).

Ген *FLD1* кодирует формальдегиддегидрогеназу — ключевой фермент метаболизма метанола и метилированных аминов, его транскрипция регулируется не только метанолом, но и метиламином. Использование *FLD1* промотора обеспечивает высокий уровень синтеза гетерологичных белков, например,  $\beta$ -лактамазы *E. coli*, в присутствии глюкозы и индуктора метиламина (Shen et al., 1998).

Ген *PHO89* — структурный ген белка переносчика фосфата. Экспрессия этого гена и гетерологичных генов, клонированных под контролем *PHO89* промотора, происходит только при дефиците неорганического фосфата в среде. Продукция липазы *B. stearotheophilus* в данной системе экспрессии была в 14 раз больше, чем при использовании сильного конститутивного *GAP* промотора (Ahn et al., 2009).

Ген *GAP* кодирует глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу. Максимальная экспрессия этого гена наблюдается в присутствии глюкозы. При использовании других источников углерода уровень мРНК *GAP* снижается примерно на 30 % (Waterham et al., 1997). Под контролем *GAP* промотора клонировали структурные гены  $\beta$ -лактамазы *E. coli*; белка Регбр, участвующего в биогенезе пероксисом, и алкогольоксидазы 1 *P. pastoris*, малатдегидрогеназы дыни, люциферазы насекомых, факто-

ра сборки пероксисом и карнитинпальмитоилтрансферазы млекопитающих (Waterham et al., 1997), трансмембранных белков-переносчиков млекопитающих и человека (Doring et al., 1998), целлюлозгидролазы *Trichoderma reesei* (Boer et al., 2000), а также HBsAg (Vassileva et al., 2001). Причем, уровень транскрипции гена *bla* и структурных генов трансмембранных белков-переносчиков млекопитающих с *GAP* промотором был выше, чем с *AOX1* промотором (Waterham et al., 1997; Doring et al., 1998). В случае целлюлозгидролазы *T. reesei* и HBsAg наблюдали противоположную картину (Boer et al., 2000; Vassileva et al., 2001).

Использование сильных промоторов (*AOX1*, *GAP* и *FLD1*) для экспрессии гетерологичных генов не всегда сопровождается высоким уровнем продукции соответствующих белков. Это, в первую очередь, касается гетерологичных белков, токсичных для дрожжей. В связи с этим, оптимальным является использование менее сильных промоторов, таких как промотор гена *YPT1*, кодирующего ГТФ-азу, и промотор гена *PEX8/PER3*, участвующего в биогенезе пероксисом (Sears et al., 1998).

Для трансформации дрожжей *P. pastoris* используют интегративные векторы. Встраивание экспрессионной кассеты в хромосомную ДНК дрожжей обеспечивает стабильность трансформантов, высокую продукцию гетерологичного белка в течение всего периода культивирования и исключает возможность горизонтального переноса бактериального репликона и генов антибиотикоустойчивости (Romanos et al., 1992; Cereghino, Cregg, 2000).

### Синтез гетерологичных белков

Многочисленные примеры успешной продукции белков разной природы в клетках дрожжей *P. pastoris* свидетельствуют об эффективной работе аппарата трансляции, шаперонов и других белков, участвующих в фолдинге. Это проявляется в том, что уровень продукции гетерологичных белков значительно выше, чем в дрожжах *S. cerevisiae*. При внутриклеточной продукции доля гетерологичного белка составляет от 2 до 30 %, при секреции до 80 % суммарного клеточного белка (Cereghino, Cregg, 2000). Кроме того, гетерологичные белки, например, интерфероны человека, находятся в цитоплазме в растворимом состоянии, а не в виде «телец включения» как в клетках дрожжей *S. cerevisiae* (Падкина и др., 2010). Это позволяет предположить, что состояние гетерологичного белка зависит от особенностей продуцента.

Основное отличие дрожжей *P. pastoris* от дрожжей *S. cerevisiae* заключается в том, что метилотрофные дрожжи являются аэробными организмами, а дрожжи-сахаромицеты относятся к факультативным анаэробам (Romanos et al., 1992). Известно, что в клетках аэробных организмов в качестве побочных продуктов дыхания образуются активные формы кислорода (АФК), которые мо-

гут вызывать повреждения нуклеиновых кислот, белков, липидов и снижать жизнеспособность клеток (Cadenas, 1989). Для нейтрализации АФК у всех организмов существуют специальные защитные механизмы, которые заключаются в усилении синтеза ферментов, обеспечивающих антиоксидантную защиту, и шаперонов (Godon et al., 1998; Nifogou et al., 2014). Похожие изменения происходят в клетке при воздействии других стрессорных факторов (Estruch, 2000), а также при сверхпродукции гетерологичных белков (Jurgen et al., 2000; Vanz et al., 2012). У дрожжей *P. pastoris*, растущих на несбраживаемых источниках углерода, активно функционируют митохондрии, вырабатываются АФК, в связи с этим у них будет больше шаперонов, чем у дрожжей *S. cerevisiae*. Возможно, именно поэтому основная масса гетерологичного белка, синтезируемого дрожжами *P. pastoris*, не образует агрегатов, а находится в растворимом состоянии.

### Секреция гетерологичных белков

Дрожжи *P. pastoris* способны осуществлять и эффективную секрецию продуктов. Продукция гетерологичных белков на 1 л среды варьировала от 49 мг гормона роста человека, до 3,6 г предшественника инсулина и 10 г сывороточного альбумина человека (Murasugi, 2010).

В качестве сигнальных последовательностей чаще всего используют препропептид  $\alpha$ -фактора (MF $\alpha$ 1) дрожжей *S. cerevisiae* (Cereghino, Cregg, 2000), в то же время, при помощи протеомного анализа проводится поиск и оценка эффективности работы сигнальных последовательностей белков дрожжей *P. pastoris* (Damasceno et al., 2012).

Процессы фолдинга белков в ЭР у метилотрофных дрожжей детально не исследованы, но наличие ортологов шаперона Kar2p и протеиндисульфидизомеразы доказано. Существуют данные, что сверхпродукция Kar2p и протеиндисульфидизомеразы способствует увеличению продукции гетерологичных белков, в частности фрагментов антител и паратиреоидного гормона человека (Damasceno et al., 2012).

Дрожжи *P. pastoris*, как и дрожжи *S. cerevisiae*, способны осуществлять N- и O-гликозилирование белков (Bretthauer, Castellino, 1999). При этом длина олигосахаридной цепи у большинства гетерологичных белков составляет от 8 до 18 маннозных остатков, что значительно меньше, чем у гликопротеинов, синтезируемых дрожжами-сахаромицетами. O-связанные олигосахариды секреторных белков *P. pastoris*, как и дрожжей-сахаромицетов, являются маннанами и содержат от 2 до 5 углеводных остатков. Важно отметить, что гликопротеины, секретируемые клетками *P. pastoris*, не содержат терминальных маннозных остатков, соединенных  $\alpha$ 1,3-связями (Gemmill, Trimble, 1999), которые являются иммуногенными для млекопитающих. Эти особенности гликозилирования секреторных белков определяют преимущество дрожжей *P. pastoris* для производства белков медицинского назначения.

В последние годы получила развитие гликоинженерия дрожжей, позволяющая получать так называемые «гуманизированные» дрожжи, способные синтезировать аутентичные гликопротеины человека. Для этого используют подходы метаболической инженерии и модифицируют весь путь биосинтеза олигосахаридного компонента гликопротеинов, делетируя гены дрожжей, контролирующие образование внешних маннозных цепей, и внедряя гены других организмов, отвечающие за образование углеводов, характерных для гликопротеинов человека (Vervecken et al., 2004; Hamilton, Gerngross, 2007; Hamilton et al., 2013). Использование таких модифицированных дрожжей позволило получить аутентичные эритропоэтин человека и антитела к CD20 и HER2 (De Pourcq et al., 2010; Beck, Reichert, 2012).

Несмотря на отмеченные преимущества дрожжей *P. pastoris*, на фармацевтическом рынке пока представлен только один препарат — Калбитор (Kalbitor, Ecallantide), созданный на основе ингибитора калликрейна и применяемый для лечения наследственного ангионевротического отека (Kyriakopoulos, Kontoravdi, 2013). По меньшей мере, еще 6 препаратов (ингибиторы ангиогенеза — ангиостатин и эндостатин; ингибитор эластазы, EGF, IGF1, альбумин) проходят клинические испытания (табл. 1) (Gerngross, 2004). Можно ожидать, что в ближайшее время будет разрешено применение и производство этих препаратов.

Использование генетически модифицированных микроорганизмов не ограничивается получением гетерологичных белков. Развитие метаболической инженерии, изменяющей исходные метаболические пути или их регуляцию за счет переноса одного или группы генов, позволяет получать микроорганизмы с более высоким уровнем продукции исследуемых соединений, а также расширить спектр используемых субстратов и синтезируемых продуктов.

При помощи метаболической инженерии получены штаммы *E. coli*, обеспечивающие биоконверсию целлюлозы и гемицеллюлозы (ксилана) в биотопливо. Для этого в *E. coli* были клонированы структурные гены ксиланазы *Clostridium stercorarium*, целлюлазы *Bacillus sp.* и  $\beta$ -глюкозидазы *Cellvibrio japonicus*, которые гидролизуют исходные субстраты до моносахаридов и обеспечивали рост генетически модифицированных бактерий. Далее в полученных рекомбинантных штаммах были клонированы гены, контролирующие синтез предшественников биотоплива — этиловых эфиров жирных кислот, бутанола или циклического терпена (пенена). Экономическая выгода от предложенной технологии переработки растительных отходов в биотопливо с использованием одного вида микроорганизмов очевидна (Vokinsky et al., 2011).

Дрожжи-сахаромицеты не способны использовать ксилосу. Изменения метаболизма дрожжей, обусловленные введением гетерологичных генов *XYL1*, *XYL2* *Pichia stipitis*, кодирующих ксилозоредуктазу и ксилитолдегид-

рогеназу, позволили получить штаммы, усваивающие ксилит и превращающие его в ксилит или в этанол (Jun, Jiayi, 2012).

Дрожжи *S. cerevisiae* не содержат ферментов  $\alpha$ -амилаз, поэтому не могут гидролизовать крахмал и использовать его в качестве источника углерода. Генетически модифицированные штаммы дрожжей, синтезирующие и секретирующие  $\alpha$ -амилазу *B. amyloliquefaciens*, глюкоамилазу *S. diastaticus* и пулулантазу *Klebsiella pneumoniae*, практически полностью расщепляют крахмал до глюкозы и могут быть востребованы в пищевой промышленности (Janse, Pretorius, 1995).

Несомненный интерес для фармацевтической промышленности представляют дрожжи *S. cerevisiae*, синтезирующие вторичные метаболиты млекопитающих и растений — стероидные гормоны (прогестерон) и флавоноиды. Дрожжи — продуценты прогестерона были получены за счет изменения пути стероидогенеза, которое заключалось в дизрупции собственного гена дрожжей, кодирующего  $\Delta 22$ -десатуразу, и введении структурных генов  $\Delta 7$ -редуктазы *Arabidopsis thaliana*, бычьих цитохрома P450, аденодоксина, аденодоксинредуктазы и  $\beta$ -оксистероиддегидрогеназы/изомеразы человека (Duport et al., 1998).

Для продукции флавоноидов были сконструированы штаммы дрожжей, которые экспрессировали структурные гены 4-кумарат-КоА-лигазы *Petroselinum crispum*, халконсинтазы, халконредуктазы и халконфлаванонизомеразы *Medicago sativa* и, используя собственный фенилаланин, синтезировали 5-оксифлаванон и 5-дезоксифлаванон (Yan et al., 2007).

Таким образом, достижения в области модификации и усовершенствования штаммов микроорганизмов — продуцентов гетерологичных белков и биологически активных соединений, относительная простота культивирования в стандартных недорогих средах и возможность выполнения требований GMP для производства интересующих продуктов, позволяет ожидать более широкого использования микробных и, в особенности, дрожжевых систем экспрессии в биотехнологии. В последние годы наблюдается тенденция увеличения доли биофармацевтических препаратов дрожжевого происхождения (Poggo et al., 2011).

Работа поддержана грантом СПбГУ 1.38.229.2014.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Глумсков В. (2007) Мировой фармацевтический рынок: состояние и тенденции // Рецепт. № 4 (54). С. 9–12.
2. Кожин С.А., Самсонова М.Г., Самбук Е.В. (1986) Изучение генетического контроля экспрессии генов, контролирующих синтез кислых фосфатаз у дрожжей // Исследования по генетике. Т. 10. С. 41–52.
3. Мясников А.Н., Смирнов М.Н., Авот А.Я. и др. (1988 а) Рекомбинантная плазмидная ДНК рJDB (MSIL), обеспечивающая синтез интерлейкина-2 человека в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, способ ее получения и штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* — продуцент интерлейкина-2 человека. Патент SU № 1770359. Бюл. № 11. 1997.
4. Мясников А.Н., Смирнов М.Н., Берзинь В.М. и др. (1988 б) Рекомбинантная плазмидная ДНК рJDB (MS105), обеспечивающая синтез человеческого альфа-N-интерферона, способ ее конструирования и штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* — продуцент человеческого альфа-N-интерферона // А.с. SU 1584188 от 19.09.1988 г.
5. Мясников А.Н., Смирнов М.Н., Свердлов Е.Д. и др. (1989) Рекомбинантная плазмидная ДНК рYGIВ, обеспечивающая синтез гамма-интерферона быка в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, способ ее получения и штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* — продуцент гамма-интерферона быка // Патент SU № 1660388. Бюл. № 18. 1995.
6. Обзор рынка биотехнологий в России и оценка перспектив его развития. (2014). Дата обращения 30.03.2015. URL: <https://www.rusventure.ru/ru/programm/analytics/>.
7. Падкина М.В., Парфенова Л.В., Градобоева А.Е. и др. (2010) Синтез гетерологичных интерферонов в клетках дрожжей *Pichia pastoris* // Прикладная биохимия и микробиология. Т. 46. № 4. С. 448–455.
8. Падкина М.В., Парфенова Л.В., Самбук Е.В. и др. (1998) Рекомбинантная плазмидная ДНК, обеспечивающая синтез фибробластного интерферона человека клетками дрожжей, способ ее конструирования и штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* — продуцент фибробластного интерферона человека // Патент РФ RU № 2180003. Бюл. № 6. 2002.
9. Румянцев А.М., Падкина М.В., Самбук Е.В. (2013) Влияние источника азота на экспрессию генов, контролирующих первые этапы утилизации метанола у дрожжей *Pichia pastoris* // Генетика. Т. 49. № 4. С. 454–460.
10. Самбук Е.В., Павлова Н.А., Шарыпова Л.А. и др. (1988) Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей. 14. Идентификация и клонирование гена *ACP5* // Вестн. Ленингр. ун-та. Сер. 3. Вып. 24. С. 300–307.
11. Симбирцев А.С. (2013) Достижения и перспективы использования рекомбинантных цитокинов в клинической практике // Медич. Академич. Журнал. Т. 13. № 1. С. 7–22.

12. Ahn J., Hong J., Park M. et al. (2009) Phosphate-responsive promoter of a *Pichia pastoris* sodium phosphate symporter // *Appl. Environ. Microbiol.* V. 75. P. 3528–3534.
13. Arico C., Bonnet C., Javaud C. (2013) N-glycosylation humanization for production of therapeutic recombinant glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* // *Methods Mol. Biol.* V. 988. P. 45–57.
14. Ballou C.E. (1974) Some aspects of the structure, immunochemistry, and genetic control of yeast mannans // *Adv. Enzymol.* V. 40. P. 239–270.
15. Bandaranayake A.D., Almo S.C. (2014) Recent advances in mammalian protein production // *FEBS Lett.* V. 588. P. 253–260.
16. Barr P.J., Cousens L.S., Lee-Ng C.T. et al. (1988) Expression and processing of biologically active fibroblast growth factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* V. 263. P. 16471–16478.
17. Barr P.J., Steimer K.S., Sabin E.A. et al. (1987) Antigenicity and immunogenicity of domains of the human immunodeficiency virus (HIV) envelope polypeptide expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Vaccine.* V. 5. P. 90–101.
18. Batard Y., Hehn A., Nedelkina S. et al. (2000) Increasing expression of P450 and P450-reductase proteins from monocots in heterologous systems // *Arch. Biochem. Biophys.* V. 379. P. 161–169.
19. Bayne M.L., Applebaum J., Chicchi G.G. et al. (1988) Expression, purification and characterization of recombinant human insulin-like growth factor I in yeast // *Gene.* V. 66. P. 235–244.
20. Beck A., Reichert J.M. (2012) Marketing approval of mogamulizumab: a triumph for glyco-engineering // *MAbs.* V. 4. P. 419–425.
21. Berlec A., Strukelj B. (2013) Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* V. 40. P. 257–274.
22. Bill R.M. (2014) Playing catch-up with *Escherichia coli*: using yeast to increase success rates in recombinant protein production experiments // *Front. Microbiol.* V. 5. 85. doi: 10.3389/fmicb.2014.00085.
23. Bitter G.A., Egan K.M. (1984) Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* from vectors utilizing the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter // *Gene.* V. 32. P. 263–274.
24. Boer H., Teeri T.T., Koivula A. (2000) Characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters // *Biotechnol. Bioeng.* V. 69. P. 486–494.
25. Bokinsky G., Peralta-Yahya P.P., George A. et al. (2011) Synthesis of three advanced biofuels from ionic liquid-pretreated switchgrass using engineered *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 108. P. 19949–19954.
26. Bretthauer R.K., Castellino F.J. (1999) Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins // *Biotechnol. Appl. Biochem.* V. 30. P. 193–200.
27. Brodsky J.L., Lawrence J.G., Caplan A.J. (1998) Mutations in the cytosolic DnaJ homologue, YDJ1, delay and compromise the efficient translation of heterologous proteins in yeast // *Biochemistry.* V. 37. P. 18045–18055.
28. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity (1989) // *Ann. Rev. Biochem.* V. 58. P. 79–110.
29. Celik E., Calik P. (2012) Production of recombinant proteins by yeast cells // *Biotechnol. Adv.* V. 30. P. 1108–1118.
30. Cereghino J.L., Cregg J.M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // *FEMS Microbiol. Rev.* V. 24. P. 45–66.
31. Chiba Y., Akeboshi H. (2009) Glycan engineering and production of 'humanized' glycoprotein in yeast cells // *Biol. Pharm. Bull.* V. 32. P. 786–795.
32. Cohen S.N., Chang A.C., Boyer H.W. et al. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 70. P. 3240–3244.
33. Couderc R., Baratti J. (1980) Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*. Purification and properties of alcohol oxidase // *Agric. Biol. Chem.* V. 44. P. 2279–2289.
34. Cousens L.S., Shuster J.R., Gallegos C. et al. (1987) High level expression of proinsulin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Gene.* V. 61. P. 265–275.
35. Damasceno L.M., Huang C.J., Batt C.A. (2012) Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 93. P. 31–39.
36. De Pourcq K., De Schutter K., Callewaert N. (2010) Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 87. P. 1617–1631.
37. Demain A.L., Vaishnav P. (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms // *Biotechnol. Adv.* V. 27. P. 297–306.
38. Dissing-Olesen L., Thaysen-Andersen M., Meldgaard M. et al. (2008) The function of the human interferon-beta 1a glycan determined *in vivo* // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* V. 326. P. 338–347.
39. Doring F., Klapper M., Theis S. et al. (1998) Use of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for production of functional mammalian membrane transport proteins in the yeast *Pichia pastoris* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 250. P. 531–535.
40. Dumont J., Legrain M., Portetelle D. et al. (1989) High yield synthesis of the bovine leukemia virus (BLV) p24 major internal protein in *Saccharomyces cerevisiae* // *Gene.* V. 79. P. 219–226.

41. Duport C., Spagnoli R., Degryse E. et al. (1998) Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast // *Nat. Biotechnol.* V. 16. P. 186–189.
42. Eckart M.R., Bussineau C.M. (1996) Quality and authenticity of heterologous proteins synthesis in yeast // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1996. V. 7. P. 525–530.
43. Erhart E., Hollenberg C.P. (1983) The presence of a defective *LEU2* gene in 2  $\mu$ m DNA recombinant plasmids of *Saccharomyces cerevisiae* is responsible for curing and high copy number // *J. Bacteriol.* V. 156. P. 625–635.
44. Estruch F. (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast // *FEMS Microbiol. Rev.* V. 24. P. 469–486.
45. Feldman D.E., Frydman J. (2000) Protein folding *in vivo*: the importance of molecular chaperones // *Curr. Opin. Str. Biol.* V. 10. P. 26–33.
46. Ferrer-Miralles N., Domingo-Espin J., Corchero J.L. et al. (2009) Microbial factories for recombinant pharmaceuticals // *Microb. Cell Fact.* V. 8. P. 17.
47. Gasser B., Prielhofer R., Marx H. et al. (2013) *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research // *Future Microbiol.* V. 8. P. 191–208.
48. Gemmill T.R., Trimble R.B. (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species // *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1426. P. 227–237.
49. Gerngross T.U. (2004) Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi // *Nature Biotechnology.* V. 22. P. 1409–1414.
50. Global Markets for Bioengineered Protein Drugs 2014. Дата обращения 30.03.2015. URL: <http://www.bcresearch.com/market-research/biotechnology/bioengineered-protein-drugs-report-bio009f.html>.
51. Godon C., Lagniel G., Lee J. et al. (1998) The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* V. 273. P. 22480–22489.
52. Goeddel D.V., Kleid D.G., Bolivar F. et al. (1979) Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 76. P. 106–110.
53. Goodman M. (2009) Market watch: sales of biologics to show robust growth through to 2013 // *Nat. Rev. Drug Discov.* V. 8. P. 837.
54. Guo Z., Sherman F. (1995) 3'-end forming signals of yeast mRNA // *Mol. Cell. Biol.* V. 15. P. 5983–5990.
55. Hamilton S.R., Cook W.J., Gomathinayagam S. et al. (2013) Production of sialylated O-linked glycans in *Pichia pastoris* // *Glycobiology.* V. 23. P. 1192–1203.
56. Hamilton S.R., Gerngross T.U. (2007) Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast // *Curr. Opin. Biotechnol.* V. 18. P. 387–392.
57. Harmsen M.M., Bruyne M.I., Raue H.A. et al. (1996) Overexpression of binding protein and disruption of the *PMR1* gene synergistically stimulate secretion of bovine prochymosin but not plant thaumatin in yeast // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 46. P. 365–370.
58. Hitzeman R.A., Chen C.Y., Hagie F.E. et al. (1983) Expression of hepatitis B virus surface antigen in yeast // *Nucl. Acid Res.* V. 11. P. 2746–2763.
59. Hitzeman R.A., Hagie F.E., Levine H.L. et al. (1981) Expression of a human gene for interferon in yeast // *Nature.* V. 293. P. 717–722.
60. Hou J., Tyo K.E., Liu Z. et al. (2012) Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Res.* V. 12. P. 491–510.
61. Huang C.J., Lin H., Yang X. (2012) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* V. 39. P. 383–399.
62. Idiris A., Tohda H., Kumagai H. et al. (2010) Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 86. P. 403–417.
63. Imperiali B., O'Connor S. (1999) Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure // *Curr. Opin. Chem. Biol.* V. 3. P. 643–649.
64. Itakura K., Hirose T., Crea R. et al. (1977) Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin // *Science.* V. 198. P. 1056–1063.
65. Janse B.J., Pretorius I.S. (1995) One-step enzymatic hydrolysis of starch using a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing alpha-amylase, glucoamylase and pullulanase // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 42. P. 878–883.
66. Johnston M., Carlson M. (1992) Regulation of carbon and phosphate utilization. In: Jones E.W., Pringle J.R., Broach J.R., editors. *The Molecular and Cell Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae: Gene Expression.* N.-Y.: CSHL Press; p.193–280.
67. Jun H., Jiayi C. (2012) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for increased bioconversion of lignocellulose to ethanol // *Indian. J. Microbiol.* V. 52. P. 442–448.
68. Jurgen B., Lin H.Y., Riemschneider S. et al. (2000) Monitoring of genes that respond to overproduction of an insoluble recombinant protein in *Escherichia coli* glucose-limited fed-batch fermentations // *Biotechnol. Bioeng.* V. 70. P. 217–224.
69. Kamionka M. (2011) Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli* // *Curr. Pharm. Biotechnol.* V. 12. P. 268–274.
70. Kang H.A., Kim S.J., Choi E.S. et al. (1998) Efficient production of intact human parathyroid hormone in a *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in yeast

- aspartic protease 3 (*YAP3*) // Appl. Microbiol. Biotechnol. V. 50. P.187–192.
71. Kerry-Williams S.M., Gilbert S.C., Evans L.R. et al. (1998) Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* *YAP3* gene reduces the proteolytic degradation of secreted recombinant human albumin // Yeast. V. 14. P. 161–169.
  72. Kim M.D., Han K.C., Kang H.A. et al. (2003) Coexpression of BiP increased antithrombotic hirudin production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biotechnol. V. 101. P. 81–87.
  73. Kramer R.A., DeChiara T.M., Schaber M.D. et al. (1984) Regulated expression of a human interferon gene in yeast: control by phosphate concentration or temperature // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 81. P. 367–370.
  74. Kurosawa K., Hosaka T., Tamehiro N. et al. (2006) Improvement of alpha-amylase production by modulation of ribosomal component protein S12 in *Bacillus subtilis* 168 // Appl. Environ. Microb. V. 72. P. 71–77.
  75. Kyriakopoulos S., Kontoravdi C. (2013) Analysis of the landscape of biologically-derived pharmaceuticals in Europe: dominant production systems, molecule types on the rise and approval trends // Eur.J. Pharm. Sci. V. 48. P. 428–441.
  76. Lee F.W., Silva N.A. (1996) Application of Ty1 for cloned gene insertion: amplification of large regulated expression cassette in *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Microbiol. Biotechnol. V. 44. P. 620–623.
  77. Lin-Cereghino G.P., Godfrey L., de la Cruz B.J. et al. (2006) Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris* // Mol Cell Biol. V. 26. P. 883–897.
  78. Liu L., Liu Y., Shin H.D. et al. (2013) Developing *Bacillus spp.* as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology // Appl. Microbiol. Biotechnol. V. 97. P. 6113–6127.
  79. Lohr D. (1997) Nucleosome transactions on the promoters of the yeast *GAL* and *PHO* genes // J. Biol. Chem. V. 272. P. 26795–26798.
  80. Lopes T.S., Klootwijk J., Veenstra A.E. et al. (1989) High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression // Gene. V. 79. P. 199–206.
  81. Lopez N., Halladay J., Walter W. et al. (1999) *SSB*, encoding a ribosome-associated chaperone, is coordinately regulated with ribosomal protein genes // J. Bacteriol. V. 181. P. 3136–3143.
  82. Macauley-Patrick, S., Fazenda M.L., McNeil B. et al. (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system // Yeast. V. 22. P. 249–270.
  83. Makrides S.C. (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli* // Microbiol. Rev. V. 60. P. 512–538.
  84. Martegani E., Brambilla L., Porro D. et al. (1993) Alteration of cell population structure due to cell lysis in *Saccharomyces cerevisiae* cells overexpressing the *GAL4* gene // Yeast. V. 9. P. 575–582.
  85. Mattanovich D., Branduardi P., Dato L. et al. (2012) Recombinant protein production in yeasts // Methods Mol. Biol. V. 824. P. 329–358.
  86. Mergulhao F.J., Summers D.K., Monteiro G.A. (2005) Recombinant protein secretion in *Escherichia coli* // Biotechnol. Adv. V. 23. P. 177–202.
  87. Miyahara A., Toh-e A., Nozaki C. et al. (1983) Expression of hepatitis B surface antigen in yeast // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 80. P. 1–5.
  88. Moore P.A., Sagliocco F.A., Wood R.M. et al. (1991) Yeast glycolytic mRNAs are differentially regulated // Mol. Cell Biol. V. 11. P. 5330–5337.
  89. Murashima K., Chen C-L., Kosugi A. et al. (2002) Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* engB, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes // J. Bacteriol. V. 184. P. 76–81.
  90. Murasugi A. (2010) Secretory expression of human protein in the yeast *Pichia pastoris* by controlled fermentor culture // Recent Pat. Biotechnol. V. 4 (2). P. 153–166.
  91. Murby M., Uhlen M., Stahl S. (1996) Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli* // Protein Expression Purif. V. 7. P. 129–136.
  92. Niforou K., Cheimonidou C., Trougakos I.P. (2014) Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance // Redox Biol. V. 2. P. 323–332.
  93. Nonaka G., Ishikawa T., Liu T.T. et al. (2000) Genetic analysis of growth inhibition of yeast cells caused by expression of *Aspergillus oryzae* RNase T1 // Biosci. Biotechnol. Biochem. V. 64. P. 2152–2158.
  94. Oshima Y. (1982) Regulatory circuits for gene expression: the metabolism of galactose and phosphate. In: Jones E. W., Pringle J.R., Broach J.R., editors. The Molecular Biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Metabolism and Gene Expression. N.-Y.: CSHL Press. P. 159–180.
  95. Payne T., Finnis C., Evans L.R. et al. (2008) Modulation of chaperone gene expression in mutagenized *Saccharomyces cerevisiae* strains developed for recombinant human albumin production results in increased production of multiple heterologous proteins // Appl. Environ. Microbiol. V. 74. P. 7759–7766.
  96. Porro D., Gasser B., Fossati T. et al. (2011) Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts: when are these systems better than bacterial production systems? // Appl. Microbiol. Biotechnol. V. 89. P. 939–948.

97. Porro D., Lotti M., Martegani E. et al. (1992) Enhanced expression of heterologous proteins by the use of a superinducible vector in budding yeast // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 36. P. 655–658.
98. Robinson A. S., Hines V., Wittrup K. D. (1994) Protein disulfide isomerase overexpression increases secretion of foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae* // *Bio/Technol.* V. 12. P. 381–384.
99. Romanos M. A., Scorer C. A., Clare J. J. (1992) Foreign gene expression in yeast // *Yeast.* V. 8. P. 423–488.
100. Rumjantsev A. M., Bondareva O. V., Padkina M. V., Sambuk E. V. (2014) Effect of Nitrogen Source and Inorganic Phosphate Concentration on Methanol Utilization and PEX Genes Expression in *Pichia pastoris*. *Scientific World Journal.* V. 2014:743615. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/743615>.
101. Sabin E. A., Lee-Ng C. T., Shuster J. et al. (1989) High-level expression and *in vivo* processing of chimeric ubiquitin fusion proteins in *Saccharomyces cerevisiae* // *Bio/Technol.* V. 7. P. 705–709.
102. Schaber M. D., De Chiara T. M., Kramer R. A. (1986) Yeast vector for production of interferon // *Meth. Enzymol.* V. 119. P. 416–423.
103. Schultz L. D., Hofmann K. J., Mylin L. M. et al. (1987) Regulated overproduction of the *GAL4* gene product greatly increases expression from galactose-inducible promoters on multi-copy expression vectors in yeast. // *Gene.* V. 61. P. 123–133.
104. Sears I. B., O'Connor J., Rossanese O. W. et al. (1998) A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris* // *Yeast.* V. 14. P. 783–790.
105. Shen S., Sulter G., Jeffries T. W. et al. (1998) A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris* // *Gene.* V. 216. P. 93–102.
106. Smith J. D., Tang B. C., Robinson A. S. (2004) Protein disulfide isomerase, but not binding protein, overexpression enhances secretion of a non-disulfide-bonded protein in yeast // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. V. 85. P. 340–350.
107. Sudbery P. E. (1996) The expression of recombinant proteins in yeast // *Curr. Opin. Biotechnol.* V. 7. P. 517–524.
108. Svaren J., Horz W. (1997) Transcription factor vs nucleosomes: regulation of the *PHO5* promoter in yeast // *Trends Biochem. Sci.* V. 22. P. 93–97.
109. Terpe K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 72. P. 211–222.
110. The M. J. (1989) Human insulin: DNA technology's first drug // *Am. J. Hosp. Pharm.* V. 46 (11 Suppl 2). S9–11.
111. Thim L., Hansen M. T., Norris K. et al. (1986) Secretion and processing of insulin precursors in yeast // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V. 83. P. 6766–6770.
112. Thomas J. G., Ayling A., Baneyx F. (1997) Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold // *Appl. Biochem. Biotechnol.* V. 66. P. 197–238.
113. Toh-e A., Kakimoto S., Oshima Y. (1975) Genes coding for the structure of the acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Gen. Genet.* V. 143. P. 65–70.
114. Trachtulec Z., Forejt J. (1999) Transcription and RNA processing of mammalian genes in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nucl. Acid Res.* V. 27. P. 526–531.
115. Ueda Y., Toh-e A., Oshima Y. (1975) Isolation and characterization of recessive, constitutive mutations for repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Bacteriol.* V. 122. P. 911–920.
116. Umehayashi K., Hirata A., Horiuchi H. et al. (1999) Unfolded protein response-induced BiP/Kar2p production protects cell growth against accumulation of misfolded protein aggregates in the yeast endoplasmic reticulum // *Eur. J. Cell Biol.* V. 78. P. 726–738.
117. Valenzuela P., Medina A., Rutter W. J. et al. (1982) Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast // *Nature.* V. 298. P. 347–360.
118. Vanz A. L., Lünsdorf H., Adnan A. et al. (2012) Physiological response of *Pichia pastoris* GS115 to methanol-induced high level production of the Hepatitis B surface antigen: catabolic adaptation, stress responses, and autophagic processes // *Microb. Cell Fact.* V. 11. P. 103. doi:10.1186/1475-2859-11-103.
119. Vassileva A., Chugh D. A., Swaminathan S. et al. (2001) Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter // *J. Biotechnol.* V. 88. P. 21–35.
120. Vervecken W., Kaigorodov V., Callewaert N. et al. (2004) *In vivo* synthesis of mammalian-like, hybrid-type N-glycans in *Pichia pastoris* // *Appl. Environ. Microbiol.* V. 70. P. 2639–2646.
121. Vogl T., Glieder A. (2013) Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production // *New Biotechnol.* V. 30. P. 385–404.
122. Walsh G. (2014) Biopharmaceutical benchmarks 2014 // *Nat. Biotechnol.* V. 32 (10). P. 992–1000.
123. Waterham H. R., Digan M. E., Koutz P. J. et al. (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter // *Gene.* V. 186. P. 37–44.
124. Westers L., Westers H., Quax W. J. (2004) *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical pro-

- teins: a biotechnological approach to optimize the host organism // *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1694. P. 299–310.
125. Widmann M., Christen P. (2000) Comparison of folding rates of homologous prokaryotic and eukaryotic proteins // *J. Biol. Chem.* V. 275. P. 18619–18622.
  126. Withers-Martinez C., Carpenter E.P., Hackett F. et al. (1999) PCR-based gene synthesis as an efficient approach for expression of the A+T-rich malaria genome // *Protein Eng.* V. 12. P. 1113–1120.
  127. Wong H.C., Chang S. (1986) Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V. 83. P. 3233–3237.
  128. Yadava A., Ockenhouse C.F. (2003) Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems // *Infect. Immun.* V. 71. P. 4961–4969.
  129. Yan Y., Huang L., Koffas M.A. (2007) Biosynthesis of 5-deoxyflavanones in microorganisms // *Biotechnol. J.* V. 2. P. 1250–1262.
  130. Zapun A., Jakob C.A., Thomas D.Y. et al. (1999) Protein folding in specialized compartment: the endoplasmic reticulum // *Structure.* V. 7. P. 173–182.
  131. Zhu J. (2012). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production // *Biotechnol. Adv.* 2012. V. 30. P. 1158–1170.
  132. Zurbriggen B., Kuhne A.B., Kallio P. et al. (1989) Controlled expression of heterologous cytochrome P450e cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Development of cultivation process for heterologous cytochrome P450e production // *J. Biotechnol.* V. 9. P. 273–286.
  3. Myasnikov A.N., Smirnov M.N., Avot A.Ya. et al. (1988a) Recombinant plasmid DNA pJDB (MSIL) providing the synthesis of human interleukin-2 in yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells, a mode of its preparation and a strain of *Saccharomyces cerevisiae* yeast — a producer of human interleukin-2 // Patent SU N.1770359. Bulletin N. 11. 1997.
  4. Myasnikov A.N., Smirnov M.N., Berzin' V.M. et al. (1988b) Recombinant plasmid DNA pJDB(MS105), providing the synthesis of human alpha-N-interferon, a mode of its preparation and a strain of *Saccharomyces cerevisiae* yeast — a producer of human alpha-N-interferon // Copyright certificate SU 1584188. 19.09.1988.
  5. Myasnikov A.N., Smirnov M.N., Sverdlov E.D. et al. (1989) Recombinant plasmid DNA pYGIB, providing the synthesis of bovine gamma-interferon in yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells, a mode of its preparation and a strain of *Saccharomyces cerevisiae* yeast - a producer of bovine gamma-interferon // Patent SU N 1660388. Bulletin N 18. 1995.
  6. The review of the market of biotechnologies in Russia and an assessment of prospects of its development. (2014). Date of the address is 30.03.2015. URL: <https://www.rusventure.ru/ru/programm/analytics/>.
  7. Padkina M.V., Parfenova L.V., Gradoboeva A.E., Sambuk E.V. (2010) Heterologous Interferons Synthesis in Yeast *Pichia pastoris* // *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* V. 46. N 4. P. 448–455.
  8. Padkina M.V., Parfenova L.V., Sambuk E.V. et al. (1998) Recombinant plasmid DNA, providing the synthesis of human fibroblast interferon, a mode of its preparation and a strain of *Saccharomyces cerevisiae* yeast - a producer of human fibroblast interferon // Patent RF N. 2180003. Bulletin N 6. 2002.
  9. Rumjantsev A.M., Padkina M.V., Sambuk E.V. (2013) Effect of Nitrogen Source on Gene Expression of First Steps of Methanol Utilization Pathway in *Pichia pastoris* // *Genetika.* V. 49. N 4. P. 454–460.
  10. Sambuk E.V., Pavlova N.A., Sharypova L.A. et al. (1988) Genetical and biochemical studies of acid phosphatases in yeast. 14. Identification and cloning of ACP5 gene // *Vestn. Leningr. Univer. Ser. 3. Is. 24.* P. 300–307.
  11. Simbirtsev A.S. (2013) Achievements and perspectives of the recombinant cytokine therapy in clinical practice // *Medical Academ. Zh.* V. 13. N 1. P. 7–22.
  12. Ahn J., Hong J., Park M. et al. (2009) Phosphate-responsive promoter of a *Pichia pastoris* sodium phosphate symporter // *Appl. Environ. Microbiol.* V. 75. P. 3528–3534.
  13. Arico C., Bonnet C., Javaud C. (2013) N-glycosylation humanization for production of therapeutic recombi-

#### GENETICALLY MODIFIED MICROORGANISMS AS PRODUCERS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

*Padkina M. V., Sambuk E. V.*

☛ **SUMMARY:** In the review the data on use of genetically modified microorganisms as producers of proteins of different organisms are presented. The relative advantages and disadvantages of bacterial and yeast systems for heterologous genes expression are considered.

☛ **KEY WORDS:** genetically modified microorganisms; heterologous gene expression; heterologous proteins.

#### ☛ REFERENCES (TRANSLITERATED)

1. Glumskov V. (2007) World pharmaceutical market: state and tendencies // *Recipe.* N. 4 (54). Page 9–12.
2. Kozhin S.A., Samsonova M.G., Sambuk E.V. (1986) Studying of genetic control of an expression of the genes controlling synthesis of yeast acid phosphatases // *Researches on genetics.* T. 10. Page 41–52.

- nant glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* // Methods Mol. Biol. V. 988. P. 45–57.
14. Ballou C.E. (1974) Some aspects of the structure, immunochemistry, and genetic control of yeast mannans // Adv. Enzymol. V. 40. P. 239–270.
  15. Bandaranayake A.D., Almo S.C. (2014) Recent advances in mammalian protein production // FEBS Lett. V. 588. P. 253–260.
  16. Barr P.J., Cousens L. S., Lee-Ng C. T. et al. (1988) Expression and processing of biologically active fibroblast growth factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. V. 263. P. 16471–16478.
  17. Barr P.J., Steimer K. S., Sabin E. A. et al. (1987) Antigenicity and immunogenicity of domains of the human immunodeficiency virus (HIV) envelope polypeptide expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Vaccine. V. 5. P. 90–101.
  18. Batard Y., Hehn A., Nedelkina S. et al. (2000) Increasing expression of P450 and P450-reductase proteins from monocots in heterologous systems // Arch. Biochem. Biophys. V. 379. P. 161–169.
  19. Bayne M.L., Applebaum J., Chicchi G.G. et al. (1988) Expression, purification and characterization of recombinant human insulin-like growth factor 1 in yeast // Gene. V. 66. P. 235–244.
  20. Beck A, Reichert J.M. (2012) Marketing approval of mogamulizumab: a triumph for glyco-engineering // MAbs. V. 4. P. 419–425.
  21. Berlec A., Strukelj B. (2013) Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. V. 40. P. 257–274.
  22. Bill R.M. (2014) Playing catch-up with *Escherichia coli*: using yeast to increase success rates in recombinant protein production experiments // Front. Microbiol. V. 5. 85. doi: 10.3389/fmicb.2014.00085.
  23. Bitter G.A., Egan K.M. (1984) Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* from vectors utilizing the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter // Gene. V. 32. P. 263–274.
  24. Boer H., Teeri T. T., Koivula A. (2000) Characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters // Biotechnol. Bioeng. V. 69. P. 486–494.
  25. Bokinsky G., Peralta-Yahya P.P., George A. et al. (2011) Synthesis of three advanced biofuels from ionic liquid-pretreated switchgrass using engineered *Escherichia coli* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 108. P. 19949–19954.
  26. Bretthauer R.K., Castellino F.J. (1999) Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins // Biotechnol. Appl. Biochem. V. 30. P. 193–200.
  27. Brodsky J.L., Lawrence J.G., Caplan A.J. (1998) Mutations in the cytosolic DnaJ homologue, YDJ1, delay and compromise the efficient translation of heterologous proteins in yeast // Biochemistry. V. 37. P. 18045–18055.
  28. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity (1989) // Ann. Rev. Biochem. V. 58. P. 79–110.
  29. Celik E., Calik P. (2012) Production of recombinant proteins by yeast cells // Biotechnol. Adv. V. 30. P. 1108–1118.
  30. Cereghino J.L., Cregg J.M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // FEMS Microbiol. Rev. V. 24. P. 45–66.
  31. Chiba Y., Akeboshi H. (2009) Glycan engineering and production of ‘humanized’ glycoprotein in yeast cells // Biol. Pharm. Bull. V. 32. P. 786–795.
  32. Cohen S.N., Chang A.C., Boyer H.W. et al. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA V. 70. P. 3240–3244.
  33. Couderc R., Baratti J. (1980) Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*. Purification and properties of alcohol oxidase // Agric. Biol. Chem. V. 44. P. 2279–2289.
  34. Cousens L.S., Shuster J.R., Gallegos C. et al. (1987) High level expression of proinsulin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Gene. V. 61. P. 265–275.
  35. Damasceno L.M., Huang C.J., Batt C.A. (2012) Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production // Appl. Microbiol. Biotechnol. V. 93. P. 31–39.
  36. De Pourcq K., De Schutter K., Callewaert N. (2010) Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives // Appl. Microbiol. Biotechnol. V. 87. P. 1617–1631.
  37. Demain A.L., Vaishnav P. (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms // Biotechnol. Adv. V. 27. P. 297–306.
  38. Dissing-Olesen L., Thaysen-Andersen M., Meldgaard M. et al. (2008) The function of the human interferon-beta 1a glycan determined *in vivo* // J. Pharmacol. Exp. Ther. V. 326. P. 338–347.
  39. Doring F., Klapper M., Theis S. et al. (1998) Use of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for production of functional mammalian membrane transport proteins in the yeast *Pichia pastoris* // Biochem. Biophys. Res. Commun. V. 250. P. 531–535.
  40. Dumont J., Legrain M., Portetelle D. et al. (1989) High yield synthesis of the bovine leukemia virus (BLV) p24 major internal protein in *Saccharomyces cerevisiae* // Gene. V. 79. P. 219–226.
  41. Duport C., Spagnoli R., Degryse E. et al. (1998) Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast // Nat. Biotechnol. V. 16. P. 186–189.

42. Eckart M.R., Bussineau C.M. (1996) Quality and authenticity of heterologous proteins synthesis in yeast // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1996. V. 7. P. 525–530.
43. Erhart E., Hollenberg C.P. (1983) The presence of a defective *LEU2* gene in 2  $\mu$ m DNA recombinant plasmids of *Saccharomyces cerevisiae* is responsible for curing and high copy number // *J. Bacteriol.* V. 156. P. 625–635.
44. Estruch F. (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast // *FEMS Microbiol. Rev.* V. 24. P. 469–486.
45. Feldman D.E., Frydman J. (2000) Protein folding *in vivo*: the importance of molecular chaperones // *Curr. Opin. Str. Biol.* V. 10. P. 26–33.
46. Ferrer-Mirallas N., Domingo-Espin J., Corchero J.L. et al. (2009) Microbial factories for recombinant pharmaceuticals // *Microb. Cell Fact.* V. 8. P. 17.
47. Gasser B., Prielhofer R., Marx H. et al. (2013) *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research // *Future Microbiol.* V. 8. P. 191–208.
48. Gemmill T.R., Trimble R.B. (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species // *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1426. P. 227–237.
49. Gerngross T.U. (2004) Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi // *Nature Biotechnology.* V. 22. P. 1409–1414.
50. Global Markets for Bioengineered Protein Drugs 2014. Дата обращения 30.03.2015. URL: <http://www.bcresearch.com/market-research/biotechnology/bioengineered-protein-drugs-report-bio009f.html>.
51. Godon C., Lagniel G., Lee J. et al. (1998) The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* V. 273. P. 22480–22489.
52. Goeddel D.V., Kleid D.G., Bolivar F. et al. (1979) Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 76. P. 106–110.
53. Goodman M. (2009) Market watch: sales of biologics to show robust growth through to 2013 // *Nat. Rev. Drug Discov.* V. 8. P. 837.
54. Guo Z., Sherman F. (1995) 3'-end forming signals of yeast mRNA // *Mol. Cell. Biol.* V. 15. P. 5983–5990.
55. Hamilton S.R., Cook W.J., Gomathinayagam S. et al. (2013) Production of sialylated O-linked glycans in *Pichia pastoris* // *Glycobiology.* V. 23. P. 1192–1203.
56. Hamilton S.R., Gerngross T.U. (2007) Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast // *Curr. Opin. Biotechnol.* V. 18. P. 387–392.
57. Harmsen M.M., Bruyne M.I., Raue H.A. et al. (1996) Overexpression of binding protein and disruption of the *PMR1* gene synergistically stimulate secretion of bovine prochymosin but not plant thaumatin in yeast // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 46. P. 365–370.
58. Hitzeman R.A., Chen C.Y., Hagie F.E. et al. (1983) Expression of hepatitis B virus surface antigen in yeast // *Nucl. Acid Res.* V. 11. P. 2746–2763.
59. Hitzeman R.A., Hagie F.E., Levine H.L. et al. (1981) Expression of a human gene for interferon in yeast // *Nature.* V. 293. P. 717–722.
60. Hou J., Tyo K.E., Liu Z. et al. (2012) Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Res.* V. 12. P. 491–510.
61. Huang C.J., Lin H., Yang X. (2012) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* V. 39. P. 383–399.
62. Idiris A., Tohda H., Kumagai H. et al. (2010) Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 86. P. 403–417.
63. Imperiali B., O'Connor S. (1999) Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure // *Curr. Opin. Chem. Biol.* V. 3. P. 643–649.
64. Itakura K., Hirose T., Crea R. et al. (1977) Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin // *Science.* V. 198. P. 1056–1063.
65. Janse B.J., Pretorius I.S. (1995) One-step enzymatic hydrolysis of starch using a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing alpha-amylase, glucoamylase and pullulanase // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 42. P. 878–883.
66. Johnston M, Carlson M. (1992) Regulation of carbon and phosphate utilization. In: Jones E. W., Pringle J. R., Broach J. R., editors. *The Molecular and Cell Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae: Gene Expression.* N.-Y.: CSHL Press; p. 193–280.
67. Jun H., Jiayi C. (2012) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for increased bioconversion of lignocellulose to ethanol // *Indian. J. Microbiol.* V. 52. P. 442–448.
68. Jurgen B., Lin H.Y., Riemschneider S. et al. (2000) Monitoring of genes that respond to overproduction of an insoluble recombinant protein in *Escherichia coli* glucose-limited fed-batch fermentations // *Biotechnol. Bioeng.* V. 70. P. 217–224.
69. Kamionka M. (2011) Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli* // *Curr. Pharm. Biotechnol.* V. 12. P. 268–274.
70. Kang H.A., Kim S.J., Choi E.S. et al. (1998) Efficient production of intact human parathyroid hormone in a *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in yeast aspartic protease 3 (*YAP3*) // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 50. P. 187–192.
71. Kerry-Williams S.M., Gilbert S.C., Evans L.R. et al. (1998) Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae*

- YAP3* gene reduces the proteolytic degradation of secreted recombinant human albumin // *Yeast*. V. 14. P. 161–169.
72. Kim M.D., Han K.C., Kang H.A. et al. (2003) Coexpression of BiP increased antithrombotic hirudin production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biotechnol.* V. 101. P. 81–87.
73. Kramer R.A., DeChiara T.M., Schaber M.D. et al. (1984) Regulated expression of a human interferon gene in yeast: control by phosphate concentration or temperature // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 81. P. 367–370.
74. Kurosawa K., Hosaka T., Tamehiro N. et al. (2006) Improvement of alpha-amylase production by modulation of ribosomal component protein S12 in *Bacillus subtilis* 168 // *Appl. Environ. Microb.* V. 72. P. 71–77.
75. Kyriakopoulos S., Kontoravdi C. (2013) Analysis of the landscape of biologically-derived pharmaceuticals in Europe: dominant production systems, molecule types on the rise and approval trends // *Eur. J. Pharm. Sci.* V. 48. P. 428–441.
76. Lee F.W., Silva N.A. (1996) Application of Ty1 for cloned gene insertion: amplification of large regulated expression cassette in *Saccharomyces cerevisiae* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 44. P. 620–623.
77. Lin-Cereghino G.P., Godfrey L., de la Cruz B.J. et al. (2006) Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris* // *Mol Cell Biol.* V. 26. P. 883–897.
78. Liu L., Liu Y., Shin H.D. et al. (2013) Developing *Bacillus spp.* as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 97. P. 6113–6127.
79. Lohr D. (1997) Nucleosome transactions on the promoters of the yeast *GAL* and *PHO* genes // *J. Biol. Chem.* V. 272. P. 26795–26798.
80. Lopes T.S., Klootwijk J., Veenstra A.E. et al. (1989) High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression // *Gene*. V. 79. P. 199–206.
81. Lopez N., Halladay J., Walter W. et al. (1999) *SSB*, encoding a ribosome-associated chaperone, is coordinately regulated with ribosomal protein genes // *J. Bacteriol.* V. 181. P. 3136–3143.
82. Macauley-Patrick, S., Fazenda M.L., McNeil B. et al. (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system // *Yeast*. V. 22. P. 249–270.
83. Makrides S.C. (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli* // *Microbiol. Rev.* V. 60. P. 512–538.
84. Martegani E., Brambilla L., Porro D. et al. (1993) Alteration of cell population structure due to cell lysis in *Saccharomyces cerevisiae* cells overexpressing the *GAL4* gene // *Yeast*. V. 9. P. 575–582.
85. Mattanovich D., Branduardi P., Dato L. et al. (2012) Recombinant protein production in yeasts // *Methods Mol. Biol.* V. 824. P. 329–358.
86. Mergulhao F.J., Summers D.K., Monteiro G.A. (2005) Recombinant protein secretion in *Escherichia coli* // *Biotechnol. Adv.* V. 23. P. 177–202.
87. Miyanohara A., Toh-e A., Nozaki C. et al. (1983) Expression of hepatitis B surface antigen in yeast // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 80. P. 1–5.
88. Moore P.A., Sagliocco F.A., Wood R.M. et al. (1991) Yeast glycolytic mRNAs are differentially regulated // *Mol. Cell Biol.* V. 11. P. 5330–5337.
89. Murashima K., Chen C-L., Kosugi A. et al. (2002) Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* engB, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes // *J. Bacteriol.* V. 184. P. 76–81.
90. Murasugi A. (2010) Secretory expression of human protein in the yeast *Pichia pastoris* by controlled fermentor culture // *Recent Pat. Biotechnol.* V. 4 (2). P. 153–166.
91. Murby M., Uhlen M., Stahl S. (1996) Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli* // *Protein Expression Purif.* V. 7. P. 129–136.
92. Niforou K., Cheimonidou C., Trougakos I. P. (2014) Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance // *Redox Biol.* V. 2. P. 323–332.
93. Nonaka G., Ishikawa T., Liu T.T. et al. (2000) Genetic analysis of growth inhibition of yeast cells caused by expression of *Aspergillus oryzae* RNase T1 // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* V. 64. P. 2152–2158.
94. Oshima Y. (1982) Regulatory circuits for gene expression: the metabolism of galactose and phosphate. In: Jones E. W., Pringle J. R., Broach J. R., editors. *The Molecular Biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae: Metabolism and Gene Expression*. N.-Y.: CSHL Press. P. 159–180.
95. Payne T., Finnis C., Evans L. R. et al. (2008) Modulation of chaperone gene expression in mutagenized *Saccharomyces cerevisiae* strains developed for recombinant human albumin production results in increased production of multiple heterologous proteins // *Appl. Environ. Microbiol.* V. 74. P. 7759–7766.
96. Porro D., Gasser B., Fossati T. et al. (2011) Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts: when are these systems better than bacterial production systems? // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 89. P. 939–948.
97. Porro D., Lotti M., Martegani E. et al. (1992) Enhanced expression of heterologous proteins by the use

- of a superinducible vector in budding yeast // Appl. Microbiol. Biotechnol. V. 36. P. 655–658.
98. Robinson A. S., Hines V., Wittrup K. D. (1994) Protein disulfide isomerase overexpression increases secretion of foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae* // Bio/Technol. V. 12. P. 381–384.
  99. Romanos M. A., Scorer C. A., Clare J. J. (1992) Foreign gene expression in yeast // Yeast. V. 8. P. 423–488.
  100. Rumjantsev A. M., Bondareva O. V., Padkina M. V., Sambuk E. V. (2014) Effect of Nitrogen Source and Inorganic Phosphate Concentration on Methanol Utilization and PEX Genes Expression in *Pichia pastoris*. Scientific World Journal. V. 2014:743615. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/743615>.
  101. Sabin E. A., Lee-Ng C. T., Shuster J. et al. (1989) High-level expression and *in vivo* processing of chimeric ubiquitin fusion proteins in *Saccharomyces cerevisiae* // Bio/Technol. V. 7. P. 705–709.
  102. Schaber M. D., De Chiara T. M., Kramer R. A. (1986) Yeast vector for production of interferon // Meth. Enzymol. V. 119. P. 416–423.
  103. Schultz L. D., Hofmann K. J., Mylin L. M. et al. (1987) Regulated overproduction of the *GAL4* gene product greatly increases expression from galactose-inducible promoters on multi-copy expression vectors in yeast. // Gene. V. 61. P. 123–133.
  104. Sears I. B., O'Connor J., Rossanese O. W. et al. (1998) A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris* // Yeast. V. 14. P. 783–790.
  105. Shen S., Sulter G., Jeffries T. W. et al. (1998) A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris* // Gene. V. 216. P. 93–102.
  106. Smith J. D., Tang B. C., Robinson A. S. (2004) Protein disulfide isomerase, but not binding protein, overexpression enhances secretion of a non-disulfide-bonded protein in yeast // Biotechnol. Bioeng. 2004. V. 85. P. 340–350.
  107. Sudbery P. E. (1996) The expression of recombinant proteins in yeast // Curr. Opin. Biotechnol. V. 7. P. 517–524.
  108. Svaren J., Horz W. (1997) Transcription factor vs nucleosomes: regulation of the *PHO5* promoter in yeast // Trends Biochem. Sci. V. 22. P. 93–97.
  109. Terpe K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems // Appl. Microbiol. Biotechnol. V. 72. P. 211–222.
  110. The M. J. (1989) Human insulin: DNA technology's first drug // Am. J. Hosp. Pharm. V. 46 (11 Suppl 2). S9–11.
  111. Thim L., Hansen M. T., Norris K. et al. (1986) Secretion and processing of insulin precursors in yeast // Proc. Natl. Acad. Sci. USA V. 83. P. 6766–6770.
  112. Thomas J. G., Ayling A., Baneyx F. (1997) Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold // Appl. Biochem. Biotechnol. V. 66. P. 197–238.
  113. Toh-e A., Kakimoto S., Oshima Y. (1975) Genes coding for the structure of the acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Gen. Genet. V. 143. P. 65–70.
  114. Trachtulec Z., Forejt J. (1999) Transcription and RNA processing of mammalian genes in *Saccharomyces cerevisiae* // Nucl. Acid Res. V. 27. P. 526–531.
  115. Ueda Y., Toh-e A., Oshima Y. (1975) Isolation and characterization of recessive, constitutive mutations for repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Bacteriol. V. 122. P. 911–920.
  116. Umebayashi K., Hirata A., Horiuchi H. et al. (1999) Unfolded protein response-induced BiP/Kar2p production protects cell growth against accumulation of misfolded protein aggregates in the yeast endoplasmic reticulum // Eur. J. Cell Biol. V. 78. P. 726–738.
  117. Valenzuela P. Medina A., Rutter W. J. et al. (1982) Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast // Nature. V. 298. P. 347–360.
  118. Vanz A. L., Lünsdorf H., Adnan A. et al. (2012) Physiological response of *Pichia pastoris* GS115 to methanol-induced high level production of the Hepatitis B surface antigen: catabolic adaptation, stress responses, and autophagic processes // Microb. Cell Fact. V. 11. P. 103. doi:10.1186/1475-2859-11-103.
  119. Vassileva A., Chugh D. A., Swaminathan S. et al. (2001) Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter // J. Biotechnol. V. 88. P. 21–35.
  120. Vervecken W., Kaigorodov V., Callewaert N. et al. (2004) *In vivo* synthesis of mammalian-like, hybrid-type N-glycans in *Pichia pastoris* // Appl. Environ. Microbiol. V. 70. P. 2639–2646.
  121. Vogl T., Glieder A. (2013) Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production // New Biotechnol. V. 30. P. 385–404.
  122. Walsh G. (2014) Biopharmaceutical benchmarks 2014 // Nat. Biotechnol. V. 32 (10). P. 992–1000.
  123. Waterham H. R., Digan M. E., Koutz P. J. et al. (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter // Gene. V. 186. P. 37–44.
  124. Westers L., Westers H., Quax W. J. (2004) *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism // Biochim. Biophys. Acta. V. 1694. P. 299–310.

125. Widmann M., Christen P. (2000) Comparison of folding rates of homologous prokaryotic and eukaryotic proteins // *J. Biol. Chem.* V. 275. P. 18619–18622.
126. Withers-Martinez C., Carpenter E. P., Hackett F. et al. (1999) PCR-based gene synthesis as an efficient approach for expression of the A+T-rich malaria genome // *Protein Eng.* V. 12. P. 1113–1120.
127. Wong H. C., Chang S. (1986) Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V. 83. P. 3233–3237.
128. Yadava A., Ockenhouse C. F. (2003) Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems // *Infect. Immun.* V. 71. P. 4961–4969.
129. Yan Y., Huang L., Koffas M. A. (2007) Biosynthesis of 5-deoxylavanones in microorganisms // *Biotechnol. J.* V. 2. P. 1250–1262.
130. Zapun A., Jakob C. A., Thomas D. Y. et al. (1999) Protein folding in specialized compartment: the endoplasmic reticulum // *Structure.* V. 7. P. 173–182.
131. Zhu J. (2012). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production // *Biotechnol. Adv.* 2012. V. 30. P. 1158–1170.
132. Zurbriggen B., Kuhne A. B., Kallio P. et al. (1989) Controlled expression of heterologous cytochrome P450e cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Development of cultivation process for heterologous cytochrome P450e production // *J. Biotechnol.* V. 9. P. 273–286.

✪ Информация об авторах

**Падкина Марина Владимировна** — д. б. н., профессор, кафедра генетики и биотехнологии. СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: mpadkina@mail.ru.

**Самбук Елена Викторовна** — д. б. н., профессор, кафедра генетики и биотехнологии. СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: esambuk@mail.ru.

**Padkina Marina Vladimirovna** — Dept. Of Genetics and Biotechnology. St. Petersburg State University. 199034, Saint Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9, Russia. E-mail: mpadkina@mail.ru.

**Sambuk Elena Viktorovna** — Dept. Of Genetics and Biotechnology. St. Petersburg State University. 199034, Saint Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9, Russia. E-mail: esambuk@mail.ru.