

**СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ШТАММОВ X-33 И Y-3489 ДРОЖЖЕЙ
KOMAGATAELLA PHAFFII КАК ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ**

Логинова С.А. (СПбГУ), Родинова М.А. (СПбГУ), Гончарова М.В. (СПбГУ)

Научный руководитель – кандидат биологических наук, научный сотрудник Румянцев
А.М. (СПбГУ)

Введение. В современной биотехнологии для производства необходимых человеку белков активно используются различные организмы-продуценты. Одними из перспективных и популярных продуцентов являются метилотрофные дрожжи *Komagataella phaffii* [1]. Однако использование штаммов этих дрожжей может быть ограничено патентами и требовать соответствующего лицензирования [2]. Такие штаммы, как X-33, которые входят в состав коммерческих наборов, распространяемых иностранными компаниями, сейчас стали менее доступны отечественным исследователям. В связи с этим возникает необходимость расширения списка используемых штаммов дрожжей *K. phaffii*. Для этого следует изучать и сравнивать возможности применения разных штаммов в качестве продуцентов нужных белков.

Целью данной работы стало сравнение эффективности синтеза рекомбинантных белков штаммами дрожжей. Был использован штамм Y-3489, доступный отечественным исследователям во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), и известный коммерческий X-33. На основе этих штаммов были получены трансформанты, содержащие репортерные системы, кодирующие различные белки. Для обеспечения экспрессии репортерных генов использовали промотор гена алкогольоксидазы 1 (*AOX1*). Помимо зелёного флуоресцентного белка (eGFP) [3], синтезируемого внутриклеточно, использовали секретируемые в среду кислую фосфатазу и бета-лактоглобулин.

Основная часть. Было отмечено, что полученные трансформанты демонстрируют различные уровни синтеза белков. Подобный феномен действительно наблюдается при получении штаммов продуцентов на основе дрожжей *K. phaffii*. Такая неоднородность может быть связана с особенностями встраивания вектора в геном дрожжей в каждом конкретном случае [4]. Таким образом, данная работа ещё раз демонстрирует, что при работе со штаммами *K. phaffii*, в том числе Y-3489, необходимо анализировать несколько трансформантов и выбирать из них наиболее продуктивный.

Эффективность синтеза внутриклеточного белка eGFP сравнивали исходя из значений абсолютной и удельной флуоресценции клеток трансформантов, полученных на основе штаммов X-33 и Y-3489. Для анализа эффективности синтеза секретируемой кислой фосфатазы измеряли её активность в среде с использованием количественной методики [5]. Эффективность синтеза бета-лактоглобулина оценивали с помощью методов белкового электрофореза и вестерн-блот гибридизации. Используя методы статистической обработки результатов [6], выяснили, что трансформанты, полученные на основе обоих штаммов, не демонстрируют достоверных различий в уровнях синтеза использованных репортерных белков.

Выводы.

1. На основе доступного во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов штамма дрожжей Y-3489 *K. phaffii* могут быть получены трансформанты, синтезирующие рекомбинантные белки не хуже, чем аналогичные штаммы на основе штамма X-33.

2. При работе со штаммом Y-3489, как и с другими штаммами *K. phaffii*, необходимо анализировать несколько трансформантов и выбирать из них наиболее продуктивный.

Список использованных источников:

1. Музаев Д. М., Румянцев А.М., Самбук Е.В., Падкина М. В. Новые штаммы дрожжей *Pichia pastoris* – продуценты гетерологичных белков. Экологическая генетика, 2015.
2. Dries Van Herpe, Robin Vanluchene, Kristof Vandewalle. OPENPichia: building a free-to-operate *Komagataella phaffii*. BioRxiv, 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.12.13.519130>.
3. Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, Lukyanov KA. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev.* 2010 Jul;90(3):1103-63. doi: 10.1152/physrev.00038.2009.
4. Vogl TGebbie L, Palfreyman RW, Speight R. 2018. Effect of Plasmid Design and Type of Integration Event on Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol* 84:e02712-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02712-17>
5. Падкина М.В., Краснопевцева Н.Г., Петрашень М.Г. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей. Характеристика кислых фосфатаз разных штаммов // Генетика. 1974. Т. 10. С. 100–111.
6. Marx A, Backes C, Meese E, Lenhof HP, Keller A. EDISON-WMW: Exact Dynamic Programing Solution of the Wilcoxon-Mann-Whitney Test. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2016 Feb;14(1):55-61. doi: 10.1016/j.gpb.2015.11.004. Epub 2016 Jan 29.