

**КОЛЛЕКЦИЯ ПЛАЗМИД ДЛЯ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ
*KOMAGATAELLA PHAFFII***

Метилотрофные дрожжи *Komagataella phaffii* являются важным организмом-продуцентом рекомбинантных белков в биотехнологическом производстве [1]. При получении штамма, синтезирующего целевой белок применяют различные методы, чтобы увеличить выход продукта [2]. Один из подходов — коэкспрессия генов регуляторных факторов, позволяющая влиять на различные стадии синтеза и секреции белка. В работах С.Н. Chang и X. Zheng было показано, что при коэкспрессии множества копий регуляторных генов *MXR1* и *FHL1*, продуктивность *K. phaffii* увеличивается на 25-30% [3-4]. При этом регуляторный фактор Mxr1 влияет на синтез белка на уровне транскрипции, а фактор Fhl1 — на уровне транскрипции и трансляции, что позволяет обходить ограничения на разных стадиях синтеза для различных белков. Получение и использование конструкций, содержащих эти гены, в условиях лаборатории СПбГУ позволит создавать новые инструменты для увеличения продуктивности значимого биотехнологического продуцента.

Целью работы является получение конструкций для обеспечения сверхэкспрессии регуляторных генов *MXR1* и *FHL1* в клетках *K. phaffii*.

Для получения плазмиды рPIC9-PAOX2-MXR1, содержащей ген *MXR1*, его последовательность была амплифицирована на основе ДНК клеток *K. phaffii* дикого типа и встроена в полученную ранее плазмиду рPIC9-PAOX2-PHO5 вместо гена кислой фосфатазы *PHO5*. Чтобы получить плазмиду рPICZ-FHL1, содержащую ген *FHL1*, его последовательность также была амплифицирована на основе ДНК клеток *K. phaffii* дикого типа и встроена в плазмиду рPICZαC. Полученные плазмиды были проверены с помощью методов ПЦР и рестрикционного анализа.

Для исследования влияния сверхэкспрессии на продуктивность дрожжей плазмидами рPIC9-PAOX2-MXR1 и рPICZ-FHL1 были трансформированы клетки, содержащие в геноме удобную репортерную конструкцию на основе гена кислой фосфатазы. Измерение активности кислой фосфатазы в трансформантах позволит сделать вывод о влиянии коэкспрессии единичных дополнительных копий генов *MXR1* и *FHL1* на продукцию гетерологичного белка.

Ключевые слова: *Komagataella phaffii*, дрожжи, биотехнология, рекомбинантные белки, плазмиды, регуляторные факторы, сверхэкспрессия, коэкспрессия

Работа выполнена при поддержке гранта Санкт-Петербургского государственного университета № 75428571.

Список литературы

1. M. Karbalaeei, S.A. Rezaee, H. Farsiani, *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins // Journal of Cellular Physiology, 2020, Vol.235, №9, P. 5867-5881.

2. L.C. Piva, M.O. Bentacur, V.C. Reis, J.L. De Marco, L.M. de Moraes, F.A. Torres, Molecular strategies to increase the levels of heterologous transcripts in *Komagataella phaffii* for protein production // *Bioengineered*, 2017, Vol.8, №5, P. 441-445.
3. C.H. Chang, H.A. Hsiung, K.L.Hong, C.T. Huang, Enhancing the efficiency of the *Pichia pastoris* *AOX1* promoter via the synthetic positive feedback circuit of transcription factor Mxr1 // *BMC Biotechnology*, 2018, Vol.18, №1, P. 81.
4. X. Zheng, Y. Zhang, X. Zhang, C. Li, X. Liu, Y. Lin, S. Liang, Fhl1p protein, a positive transcription factor in *Pichia pastoris*, enhances the expression of recombinant proteins // *Microbial Cell Factories*, 2019, Vol.18, №1, P. 207.