

УДК 602.643

АНАЛІЗ ПЛАЗМІДНОЇ КАРТИ ВЕКТОРНОЇ СИСТЕМИ ЕКСПРЕСІЇ НАТИВНОГО БІЛКА pYES2 І ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ У ФАРМАЦЕВТИЧНІЙ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Решетняк Людмила Расулівна

Кафедра біотехнології
Національний авіаційний університет
Київ, Україна

Коломієць Ангеліна Аланівна

КНП «Київська міська клінічна лікарня №12»
Київ, Україна

Реферат: З появою атомно-силових скануючих зондових мікроскопів із високим розрішенням з'явилися нові можливості аналізу змін на молекулярному рівні структурної організації життя, що виникають під час розвитку патологічних процесів і є їх фундаментальною основою. Результати досліджень молекулярних механізмів виникнення і розвитку багатьох патологій сприяли пошуку нових терапевтичних мішеней, розробці нових стратегій і підходів до лікування. Стала можливою детекція багатьох генних, геномних і епігеномних порушень, що майже завжди супроводжуються наявністю кількісних та/або якісних дефектів кінцевих продуктів експресії (протеїнів), а отже виникла потреба у заміщенні таких дефектних продуктів з метою лікування. На відміну від традиційних методів молекулярної біології сучасні технології синтезу генів дозволяють отримати майже будь-яку ДНК-конструкцію, зберегти час та ресурси. Синтетичні продукти відрізняються більш високим рівнем експресії, більшою стабільністю і якістю, оскільки проходять жорсткий контроль методом повного секвенування кінцевих продуктів із майже 100% «читабельністю» сконструйованих послідовностей. Висока якість кінцевих продуктів-протеїнів має особливе значення для фармацевтичної біотехнології оскільки дозволяє отримати високоякісні і високоафінні субстрати, такі як аналоги інсулінів із регульованим за тривалістю профілем дії, аналоги людського глюкагоноподібного пептида-1, аналоги соматотропного гормону тощо. Для отримання продуктів експресії сконструйованих генів використовуються векторні системи експресії нативного білка, за допомогою яких відбувається перенос інформації за схемою «ДНК – РНК – білок». Використання векторних систем експресії білка дозволяє налагодити виробництво великих об'ємів фармпрепаратів протеїнової структури із попередньо заданою конструкцією шляхом модифікування генетичного апарату мікроорганізмів-продуцентів, що не супроводжується особливими вимогами до культивування та дозволяє значно скоротити час на виробництво. У даній роботі проведено аналіз плазмідної карти сучасного вектора системи експресії білка pYES2.

Ключові слова: векторні системи експресії білків, pYES2, *Saccharomyces cerevisiae*, фармацевтична біотехнологія, секвенування генів.

I. ВСТУП

Із підвищенням доступності діагностичних систем молекулярної діагностики у медицині широко застосовуються імуногістохімічні методи, генетичне профілювання та ін. з метою морфологічної верифікації причин захворювань шляхом детекції патологічних змін на молекулярному і навіть атомарному рівні. Цитологічна діагностика використовується рутинно, оскільки має меншу вартість і не потребує залучення нової спеціальної дороговартісної апаратури. Але очевидно, що молекулярні методи

діагностики сприяють більш точному встановленню причини захворювання, більшій таргетизації підходів до лікування, а отже і кращим результатам. За таких умов очікуваним є збільшення частоти використання молекулярних методів діагностики, а отже і зменшення собівартості досліджень, що сприятиме підвищенню доступності їх для лікарів і пацієнтів.

Діагностика із застосуванням сучасних технологій синтезу генів є більш ефективною для пошуку фундаментальних причин захворювань і супроводжується накопиченням пулу інформації щодо нових

потенційних терапевтичних мішеней, що є базисом для розробки нових препаратів для лікування. Основна активна речовина таких препаратів представлена протеїнами, функціональна активність яких визначається відповідністю послідовностей амінокислот ланцюга та просторовою орієнтацією. Отже, чим більш точною буде відповідність цих параметрів кінцевого синтетичного продукту вимогам, тим більшою активністю і таргетністю він буде наділений. Висока афінність кінцевої молекули препарату важлива оскільки визначає спорідненість субстрату із рецептором і функціональну активність препарату. Збереження цього принципу особливо важливе при виробництві фармацевтичних препаратів пептидної структури, таких як аналоги соматотропного гормону (гормону росту людини), людського глюкагоноподібного пептиду-1 та препаратів аналогів інсуліну із можливістю модифікації кількісних і якісних показників профілю активності, препаратів імунотерації для лікування онкологічних захворювань.

Для налагодження масового виробництва білкових препаратів для таргетної терапії захворювань, в основі яких лежать генні, геномні та епігеномні порушення, ключовим питанням є пошук технологій, що дозволяють отримати великий об'єм якісного продукту за короткий час із залученням мінімальної кількості ресурсів.

Найсучасніші підходи передбачають застосування векторних систем трансформації генетичного апарату мікроорганізмів-продуцентів з метою надання їм властивостей продукувати конкретні пептидні послідовності за попередньо заданими схемами.

II. МЕТА РОБОТИ

Метою роботи є проведення аналізу послідовностей вектора системи експресії білка pYES2, оцінка переваг та недоліків використання даного вектора для потреб фармацевтичної і молекулярної біотехнології.

III. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для проведення аналізу послідовностей вектора системи експресії білка pYES2 використано плазмідну карту вектора, описовий, аналітичний метод.

IV. АНАЛІЗ ПЛАЗМІДНОЇ КАРТИ ВЕКТОРНОЇ СИСТЕМИ ЕКСПРЕСІЇ НАТИВНОГО БІЛКА pYES2

На рис. 1 представлено плазмідну карту вектора експресії нативного білка pYES2. Цей вектор використовується зокрема для трансформації генетичного матеріалу дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [1-4] і відноситься до найсучаснішого типу векторних систем, регульованих за числом копій. Вектор pYES2 - це плазміда, геном якої містить у своєму складі ряд специфічних послідовностей. Природна плазміда є альтернативною транспортною формою ДНК. pYES2 є синтетичною плазмідною, має кільцеву ДНК-форму що створена із застосуванням методів генної інженерії і складається з кількох тисяч пар нуклеотидів. Наявність унікальної комбінації послідовностей надає плазміді pYES2 особливі переваги в контексті використання її у якості основи [6-9]. векторної системи трансформації продуцента-дріжджів.

Зокрема, pYES2 має послідовність *ori* і промотор GAL1. *ori* є точкою старту реплікації і забезпечує самостійний процес реплікації всередині клітини-хазяїна. Промотор GAL1 входить у склад експресійної касети pYES2 та активується галактозою. Інгібування GAL1 відбувається за присутності глюкози. В контексті фармацевтичної біотехнології наявність GAL1 дає можливість регулювати активність експресії та модифікувати її шляхом підбору спеціальних поживних середовищ, а також збагаченням їх окремими компонентами потрібний відрізок часу з метою регуляції швидкості експресії.

Для культивування дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* рекомендовано використовувати насичене середовище YPD (YEFD), що містить дріжджовий екстракт, пептон та декстрозу або середовище YPDS, в

якому окрім дріжджового екстракту, пептону і декстрази міститься сорбіт.

Перевагою наявності у pYES2 послідовності *2μ ori* є функція забезпечення підтримки високого числа копій. Наявність цієї функції у системі експресії нативного білка є вирішальною у випадках коли основним завданням є отримання високого рівня експресії заданої послідовності білка оскільки передбачається, що експресований білок повинен транспортуватися крізь мембрану клітини-хазяїна назовні [10].

Механізми транспорту білка через мембрани мають деякі обмеження у пропускній здатності за одиницю часу, а отже збільшувати вихід експресованого білка доцільно не за рахунок збільшення кількості комплементарних послідовностей у складі однієї плазмиди, а за рахунок збільшення кількості плазмід. Таким чином можна запобігти накопиченню експресованого білка всередині клітини-хазяїна через неспроможність вчасно вивести його крізь мембрану назовні [10].

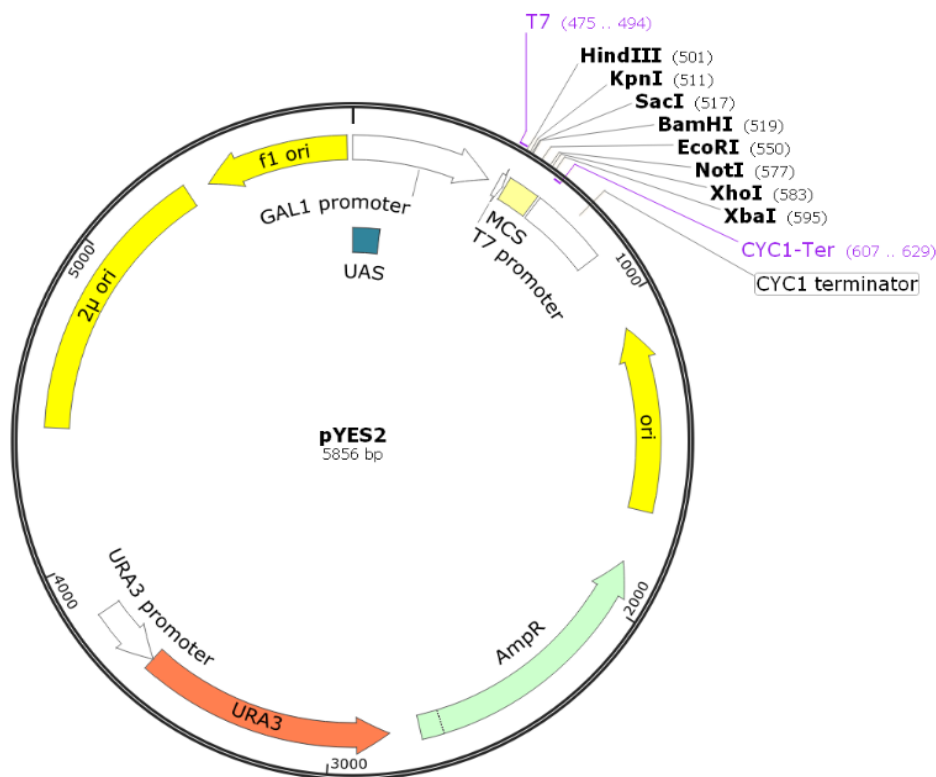


Рис. 1. Плазмідна карта вектора pYES.

З іншого боку, недолік опції *2μ ori* виявляється у більшій кількості продуктів метаболічних відходів, що вимагає підвищеної уваги на етапах очищення готового продукту, а також більш ретельного контролю за ступенем сприятливості умов навколишнього середовища, оскільки накопичення продуктів метаболізму сприятиме гіршому споживанню мікроорганізмами компонентів поживного середовища, падінню рівня експресії стимулюючих синтез ділянок, а

отже і сповільненням синтезу. Також велика кількість метаболічних відходів продуцента потребуватиме вдосконалення методів очистки кінцевого продукту, важливо враховувати що методи очистки повинні бути дієві і одночасно щадні щодо кінцевого продукту. Слід приділити особливу увагу контролю за збереженням стабільності структури кінцевого продукту після застосування додаткових стадій очистки та/або більш агресивних методів очистки.

Наявність гену *URA3* забезпечує експресію плазмідних векторів pYES2 у клітинах дріжджів. Послідовність *AmpR* відповідає за стійкість плазмід pYES2 до ампіциліну та забезпечує селективність дії антибіотику з метою підтримки стерильності культури продуцента [10]. Також у pYES2 присутні послідовності для взаємодії з різними рестрикційними ферментами (*MCS*) [10].

V. КОНСТРУЮВАННЯ ВЕКТОРНИХ СИСТЕМ В УКРАЇНІ – РЕАЛЬНІСТЬ

З 2020 року технології створення векторних систем, що містять синтетичні гени, доступні і в Україні. Створення майже будь-якої послідовності із наступним встановленням її у векторну систему експресії білка сьогодні відбувається за принципами, подібними до розробки і встановлення додатків у смартфон чи інший гаджет. Наприклад, використання спеціального програмного забезпечення, що оптимізує послідовності генів, дозволяє отримати задану послідовність для синтезу високоекспресованих білків, при цьому значно зменшуючи вартість експериментів і заощаджуючи час. Перевагою є не лише оптимізація кодонів, але і покращення кінцевих продуктів експресії білків за кількісними і якісними параметрами.

Стандартний термін синтезу прямопропорційно залежить від довжини фрагмента. Усі гени, синтезовані на замовлення, секвенуються відповідно до системи якості ISO 9001:2008. Готові ДНК-конструкції на 100% перевірені методом секвенування і мають надвисоку точність. Загальна вартість синтезу генів за новими технологіями менша, ніж витрати на купівлю реактивів і обладнання для клонування, але досі залишається високою.

VI. ВИСНОВКИ

Перераховані функціональні особливості векторної системи експресії білка pYES2 свідчать про її переваги для практичного використання у якості основи

вектора трансформації дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* з метою отримання високоафінного протеїну із заданою послідовністю амінокислотних залишків. Особливої практичної цінності цій векторній системі надає те, що саме дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* все частіше використовуються у якості продуцента. Їх переваги полягають у низькій вартості, невибагливості до умов зберігання і культивування, високій швидкості росту, можливості регулювати рівень експресії у широкому діапазоні, здатності до росту на простих поживних середовищах та низькому ризику контамінації. Сьогодні існує значний пул накопиченої інформації щодо методів і способів вдосконалення процесів культивування продуцентів *Saccharomyces cerevisiae*, що є додатковим стимулом для обрання продуцентом саме цього мікроорганізму. Отже, вибір системи експресії нативного білка pYES2, сумісної із цим мікроорганізмом-продуцентом білка асоційований із оптимізацією використання ресурсів без втрати потенціалу для впровадження інноваційних практик фармацевтичної біотехнології.

Перевагою використання плазмідного вектора pYES2 також є порівняно швидка технологія виготовлення і можливість швидко налагодити виробництво препаратів складної протеїнової структури у промислових масштабах, що відповідає потребам клінічної онкології для реалізації сучасних прецизійних підходів до лікування.

Недоліком застосування векторних систем експресії нативного білка слід вважати вплив на навколишнє середовище і людей, що безпосередньо працюють із таким матеріалом. Вплив на навколишнє середовище фармацевтичного виробництва із використанням векторних систем експресії нативних білків полягає у застосуванні екстрадерних мобільних форм ДНК (плазмід), що піддаються генетичному модифікуванню шляхом додавання до геному послідовностей,

кодує необхідні білки [10]. При цьому використовуються ферментні системи (рестриктази та ін.), що за своєю природою є універсальними для окремих штамів мікроорганізмів [10] і при потраплянні у зовнішнє середовище можуть вступати у взаємодію з представниками його мікробіому. Передбачити результати такої взаємодії неможливо, можна лише констатувати, що наслідки будуть переважно негативними і не піддаватимуться зовнішньому впливу. Неконтрольованість виступатиме додатковим фактором ризику.

Ризики для навколишнього середовища, що виникають при використанні генетично модифікованих організмів, пов'язані як із впливом на біологічні системи середовища та механізми їх взаємовідносин, так і з впливом на мікробний пейзаж слизових оболонок та шкіри кожної окремої людини, яка контактує з такими організмами [10]. Особливістю також є дуже висока швидкість розмноження мікроорганізмів за сприятливих умов та відсутність ефективних методів боротьби з поширенням таких мікроорганізмів [10].

Розповсюдження генетично модифікованих мікроорганізмів у

навколишньому середовищі залежить від ступеня сприятливості зовнішніх умов (температура, вологість, освітлення, наявність поживних речовин тощо), які є специфічними для кожного окремого виду і штаму [10]. Зокрема, мають значення параметри кількісного та якісного складу повітря, вологість, температура та матеріали поверхонь, наявність чи відсутність у середовищі інших мікроорганізмів (наприклад, тих що є природними антагоністами) тощо. Наявність сприятливих параметрів за цими факторами для конкретного штаму мікроорганізму сприятиме підвищенню швидкості його розмноження та збільшенню відстані поширення [10].

Фінансування. Дане дослідження не отримувало зовнішнього фінансування.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Згода на публікацію. Пацієнти не приймали участі у даному дослідженні.

ORCID ID.

0000-0002-0049-4851(C,E,F)

Liudmyla Reshetniak

0009-0004-7580-

8394(A,B,D) Anhelina Kolomiets

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Beaudoin F, Gable K, Sayanova O, Dunn T, Napier JA. A *Saccharomyces cerevisiae* gene required for heterologous fatty acid elongase activity encodes a microsomal beta-keto-reductase. *J Biol Chem*. 2002 Mar 29;277(13):11481-8. doi: 10.1074/jbc.M111441200. Epub 2002 Jan 15. PMID: 11792704.
2. Piraine REA, Gonçalves VS, Dos Santos Junior AG, Cunha RC, de Albuquerque PMM, Conrad NL, Leite FPL. Expression cassette and plasmid construction for Yeast Surface Display in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*. 2021 Aug;43(8):1649-1657. doi: 10.1007/s10529-021-03142-w. Epub 2021 May 2. PMID: 33934257.
3. Tsai HC, Hsieh CH, Hsu CW, Hsu YH, Chien LF. Cloning and Organelle Expression of Bamboo Mitochondrial Complex I Subunits Nad1, Nad2, Nad4, and Nad5 in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 6;23(7):4054. doi: 10.3390/ijms23074054. PMID: 35409414; PMCID: PMC8999482.
4. Ma J, Yan HH, Qin CQ, Liang YX, Ren DF. Accumulation of Astaxanthin by Co-fermentation of *Spirulina platensis* and Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2022 Feb;194(2):988-999. doi: 10.1007/s12010-021-03666-x. Epub 2021 Sep 30. PMID: 34591255.
5. Zuo W, Kang N, Li C, Luan Y, Tong X, Dai F, Lu C. [Cloning and function analysis of elongase of very long chain fatty acid gene Bmelo424 in silkworm]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2019 Mar 25;35(3):435-444. Chinese. doi: 10.13345/j.cjb.180408. PMID: 30912352.
6. Kida A, Ikeda T, Seto H, Iida Y. [Evaluation of Conventional Antifungal Agents against Recombinant Yeast Overexpressing β -1,3-Glucanase]. *Yakugaku Zasshi*. 2018;138(6):837-842. Japanese. doi: 10.1248/yakushi.17-00197. PMID: 29863056.
7. Meng JG, Zhang XD, Tan SK, Zhao KX, Yang ZM. Genome-wide identification of Cd-responsive NRAMP transporter genes and analyzing expression of NRAMP 1 mediated by miR167 in *Brassica napus*. *Biometals*. 2017 Dec;30(6):917-931. doi: 10.1007/s10534-017-0057-3. Epub 2017 Oct 9. PMID: 28993932.
8. Yin J, Li X, Zhan Y, Li Y, Qu Z, Sun L, Wang S, Yang J, Xiao J. Cloning and expression of BpMYC4 and BpbHLH9 genes and the role of BpbHLH9 in triterpenoid synthesis in birch. *BMC Plant Biol*. 2017 Nov 21;17(1):214. doi: 10.1186/s12870-017-1150-z. PMID: 29162040; PMCID: PMC5698961.

-
9. Rono JK, Le Wang L, Wu XC, Cao HW, Zhao YN, Khan IU, Yang ZM. Identification of a new function of metallothionein-like gene OsMT1e for cadmium detoxification and potential phytoremediation. *Chemosphere*. 2021 Feb;265:129136. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.129136. Epub 2020 Nov 28. PMID: 33276998.
10. Коломієць А.А. Розробка препаратів інсуліну у фіксованій комбінації з C-peptide з підвищеним фармакологічним потенціалом. Магістерська кваліфікаційна робота. НАУ, 2021.

UDC 602.643

ANALYSIS OF THE PLASMID MAP OF NATIVE PROTEIN EXPRESSION VECTOR SYSTEM pYES2 AND PROSPECTS OF APPLICATION IN PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY

Liudmyla Reshetniak

ludres@ukr.net

Department of Biotechnology

National Aviation University

Kyiv, Ukraine

Anhelina Kolomiets

dr.air@i.ua

Kyiv City Clinical Hospital №12

Kyiv, Ukraine

Abstract: With the invention of high-resolution atomic force scanning probe microscopes, new opportunities have emerged to analyze changes at the molecular level of the structural organization of life that occur during the pathological processes development and are their fundamental basis. The results of the research into the molecular mechanisms of the onset and development of many pathologies have contributed to the search for new therapeutic targets, the development of new strategies and approaches to treatment. It has become possible to detect many gene, genomic, and epigenomic disorders, which are almost always accompanied by quantitative and/or qualitative defects in the final products of expression (of proteins), and therefore the need to replace such defective products for treatment purposes has arisen. Unlike traditional methods of molecular biology, modern gene synthesis technologies allow obtaining almost any DNA structure, saving time and resources. Synthetic products are characterized by a higher level of expression, greater stability and quality, since they undergo strict control by complete sequencing of the final products with almost 100% readability of the designed sequences. The high quality of final protein products is of particular importance for pharmaceutical biotechnology, as it allows obtaining high-quality and high-affinity substrates, such as insulin analogs with an adjustable duration of action profile, human glucagon-like peptide-1 analogs, somatotropin hormone analogs, etc. In order to obtain the expression products of engineered genes, native protein expression vector systems are used, which transfer information according to the "DNA-RNA-protein" scheme. The use of protein expression vector systems allows to adjust the production of large volumes of protein structure pharmaceutical preparations with a predetermined structure by modifying the genetic apparatus of producer microorganisms, which is not accompanied by special requirements for cultivation and allows to significantly reduce production time. This paper deals with the analysis of the plasmid map of the modern pYES2 protein expression system vector. (1800-2000 знаків).

Key words: protein expression vector system, pYES2, *Saccharomyces cerevisiae*, pharmaceutical biotechnology, gene sequencing.