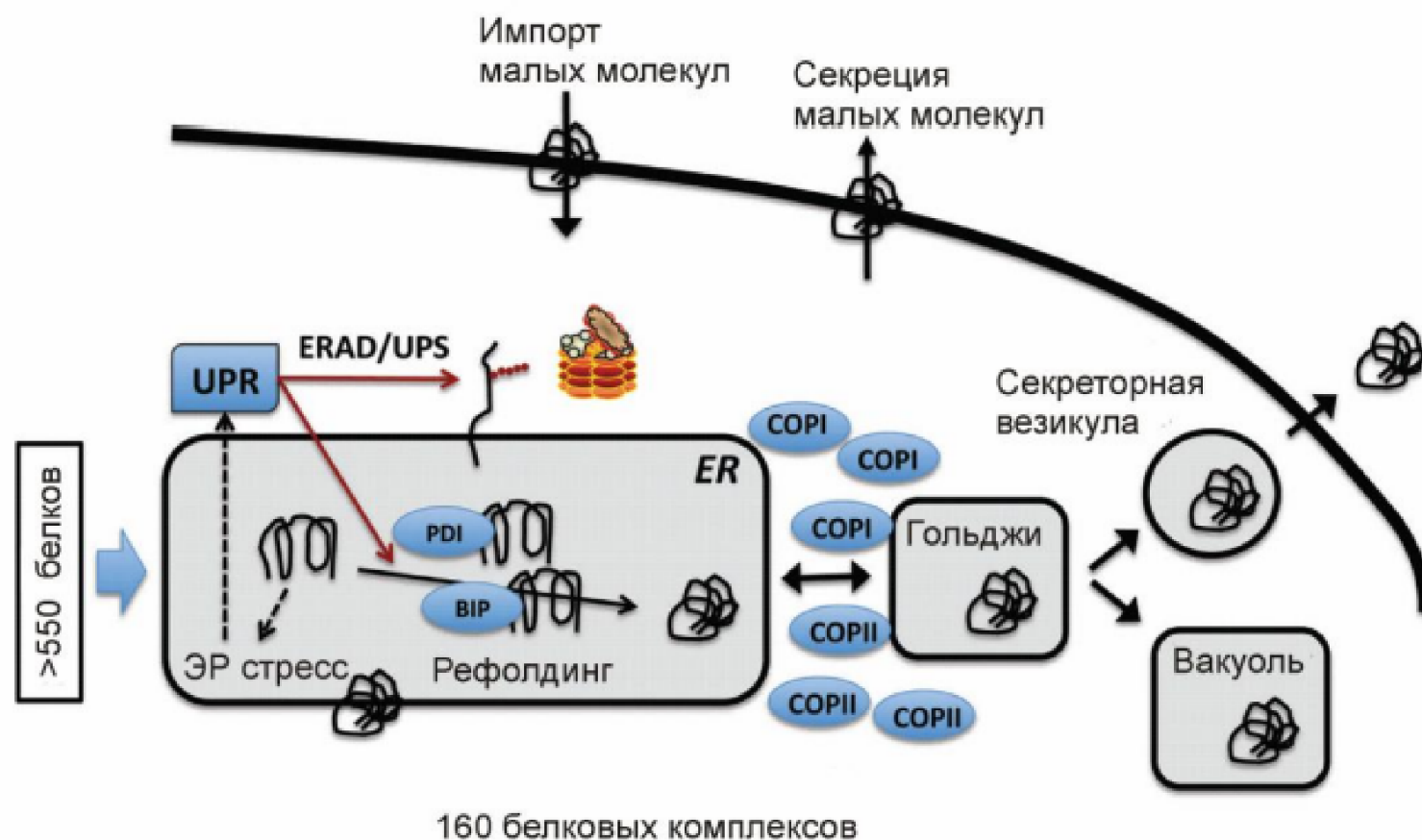


***Повышение
эффективности
секреции***

Производство белка имеет широкое применение в науках о жизни, биотехнологии, медицине и тд. Нитчатые грибы являются мощными и эффективными клеточными фабриками для производства белка в промышленных масштабах, и более половины коммерчески доступных белков были произведены нитчатыми грибами. Многие виды нитевидных грибов, как правило, считаются безопасными (GRAS) и обладают превосходной способностью выделять белки. Например, 25-30 г/л глюкоамилазы было получено из ферментационной среды *Aspergillus niger*, в то время как *Trichoderma reesei* была способна выделять 100 г/л целлюлозы. По сравнению с прокариотами, нитчатые грибы обладают зрелыми системами посттрансляционного процессинга (например, гликозилирования, расщепления протеазой и образования дисульфидных связей), которые необходимы для функционирования и активности белка.

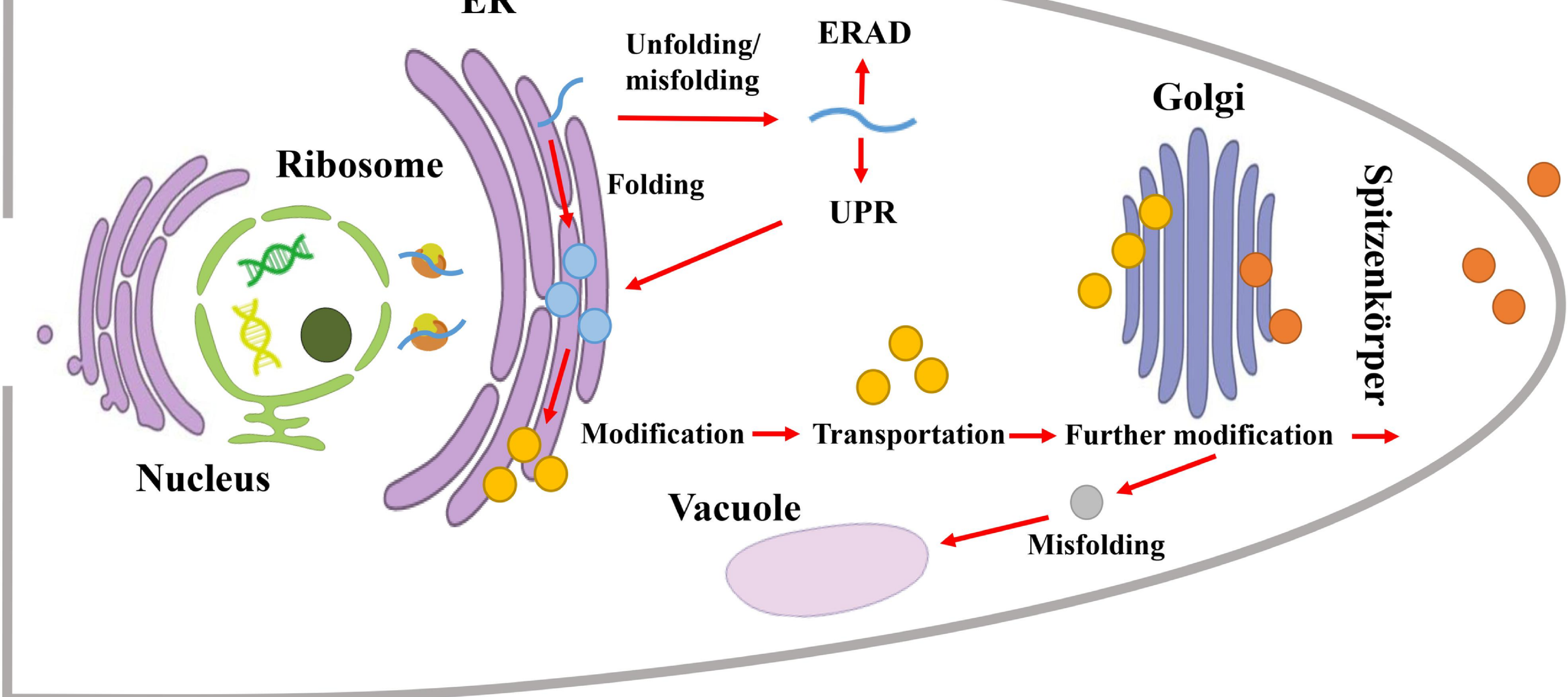


Хотя дрожжи способны выполнять посттрансляционную модификацию, они, как правило, продуцируют белки в форме гликозилирования с высоким содержанием маннозы. Напротив, нитчатые грибы имеют менее выраженное гиперманнозилирование гликопротеинов, которые могут быть непосредственно преобразованы в гликопротеины млекопитающего типа с фармацевтическим потенциалом



Кроме того, из-за метаболического разнообразия нитчатые грибы могут эффективно использовать многие типы моносахаридов, включая ксилозу, арабинозу и галактозу, в то время как дрожжи могут метаболизировать только глюкозу и маннозу

Рисунок 1. Секреторный путь дрожжевой клетки.



Путь секреции белка у нитчатых грибов



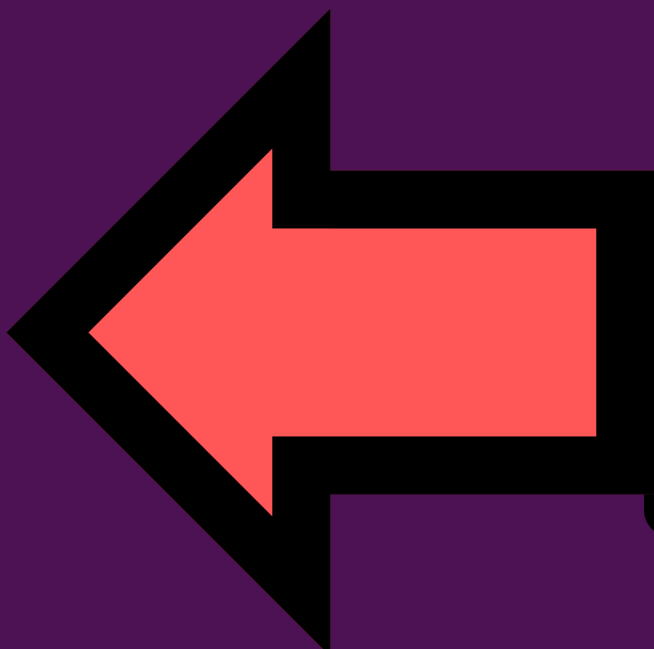
Unfolded/ misfolded protein



Folded protein



Modified protein



Путь секреции белка у нитчатых грибов включает три основных этапа, включая: перенос полипептида из рибосомы в эндоплазматический ретикулум (ER), сворачивание и модификацию белка в ER, транспортировку свернутых белковых пузырьков в аппарат Гольджи и внеклеточную среду. На первом этапе ко- или посттрансляционный транспортный путь отвечает за перенос полипептида от рибосомы к ER. В пути котрансляционного транспорта частица распознавания сигнального пептида (SRP) сначала связывается с последовательностью сигнального пептида, блокируя трансляцию. Затем SRP направляет рибосома-мРНК-зарождающийся пептидный комплекс на мембрану ER и связывается с рецептором SRP. Впоследствии SRP высвобождается из комплекса, трансляция возобновляется, и зарождающийся полипептид попадает в просвет ER через транспортный комплекс Sec61p. В посттрансляционном транспортном пути зарождающийся полипептид транслируется в цитозоль и сохраняется развернутым путем взаимодействия с шапероном Hsp70 и сопутствующими шаперонами. Этот комплекс способен воздействовать на ER посредством взаимодействия с подкомплексом мембранных рецепторов Sec62p-Sec72p-Sec73p. Белок иммуноглобулина, связывающего шаперон в просвете ER (BiP), и мембранный белок Sec63p помогают вышеупомянутому комплексу проникать в ER.

Вторым этапом является сворачивание и модификация белка в ER, что требует содействия ряда молекулярных шаперонов и ферментов сворачивания, включая калнексин (ClxA), BiP и протеиндисульфидизомеразу

Третьим этапом является транспортировка свернутых белковых пузырьков в аппарат Гольджи путем слияния с мембраной-мишенью и выделение их во внеклеточную среду

Различные стратегии для усиления экспрессии и секреции белка с помощью генной инженерии

Для усиления экспрессии и секреции белка у нитчатых грибов эффективной стратегией является усиление внутриклеточной продукции белка путем оптимизации транскрипции или кодона целевого белка

Protein of interest and its origin	Host	Strategy	Fold-change of protein secretion	References
α -Galactosidase from <i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	Replacing the original signal peptide with a glucoamylase (GlaA) signal peptide in <i>A. niger</i>	Approximately 9-fold increase	Xu et al., 2018
Erythropoietin from human	<i>T. reesei</i>	Adopting the cellobiohydrolase I (CBH) signal peptide and optimizing <i>cbh1</i> promoter	Not applicable	Zhong et al., 2011
Chymosin from bovine	<i>A. oryzae</i>	Fusing target protein with a naturally secreted protein α -amylase	2-fold increase	Ohno et al., 2011
β -Glucuronidase from <i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	Regulating the UPR and ERAD by overexpression of <i>sttC</i> and deletion of <i>dorA</i>	Not quantified	Jacobs et al., 2009
Glucose oxidase from <i>A. niger</i>	<i>T. reesei</i>	Regulating the UPR and ERAD by overexpression of <i>bip1</i> or <i>hac1</i>	1.5–1.8-fold increase	Wu et al., 2017
Glucose oxidase from <i>T. reesei</i>	<i>T. reesei</i>	Optimizing the intracellular transport process by overexpression of <i>snc1</i>	2.2-fold increase	Wu et al., 2017
Prochymosin from bovine	<i>A. niger</i>	Optimizing the intracellular transport process by deletion of <i>Aovip36</i> or <i>Aoemp47</i> , and fusing the target protein with α -amylase	Approximately 2-fold increase	Hoang et al., 2015
Cellulase from <i>T. reesei</i>	<i>T. reesei</i>	Constructing a protease-deficient strain by deletion of <i>res-1</i> , <i>cre-1</i> , <i>gh1-1</i> , and <i>alp-1</i>	5-fold increase	Liu et al., 2017
Laccase from <i>Trametes versicolor</i>	<i>A. niger</i>	Constructing a protease-deficient strain by deletion of <i>pepAa</i> , <i>pepAb</i> , or <i>pepAd</i>	1.21–1.42-fold increase	Wang et al., 2008
Glucoamylase from <i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	Regulating mycelium morphology by deletion of <i>racA</i>	4-fold increase	Fiedler et al., 2018
Cellulase from <i>N. crassa</i>	<i>N. crassa</i>	Regulating SREBP by deletion of <i>dsc-2</i> , <i>tul-1</i> , <i>sah-2</i> , <i>dsc-4</i> , <i>scp-1</i> , or <i>rbd-2</i>	Not quantified	Reilly et al., 2015; Qin et al., 2017

Типичные примеры генной инженерии нитчатых грибов для усиления секреции белка.

Замена исходного сигнального пептида на более эффективный

Сигнальная пептидная последовательность играет жизненно важную роль в секреции белка.

Замена целевого белка более эффективным пептидом имеет тенденцию повышать эффективность его секреции. Хи и др. заменили исходный сигнальный пептид AglB α -галактозидазы сигнальным пептидом глюкоамилазы (GlaA) у *A. niger*, и активность внеклеточной α -галактозидазы увеличилась почти в девять раз. Ван и др. использовали зеленый флуоресцентный белок в качестве репортерного гена у *P. oxalicum* для проверки эффективности секреции трех сигнальных пептидов: RoxGA15A, RoxAmy13A и RoxCbhCel7A-2. Затем они выбрали оптимальный сигнальный пептид RoxGA15A для стимулирования секреции эндогенных ферментов, разлагающих сырой крахмал, что в 3,4 раза выше, чем у родительского штамма

Слияние гетерологичного белка с естественным секретиремым

Слияние гетерологичного белка с естественным секретиремым белком может повысить стабильность белка, способствовать транслокации и предотвращать деградацию белка. Слияние человеческого белкового гранулоцитарного колониестимулирующего фактора с эндогенной высокосекретиремой глюкоамилазой позволило *A. niger* секретиции 5-10 мг/ л G-CSF . Когда бычий химозин (CHY) слили с альфа-амилазой (AmyB), сконструированный *A. oryzae* смог продуцировать в два раза большее количество CHY, чем при отсутствии слитого CHY, в то время как множественные гены, участвующие в сворачивании ER и пути секретиции белка, значительно увеличились в слитом штамме, продуцирующем CHY . Следует отметить, что слитый белок-носитель может сильно влиять на секрецию. Чтобы секретировать белок β -глюкуронидазы *E-coli* в *Penicillium f*, исследователи попытались использовать ксиланазу в качестве носителя. Модульная структура, каталитический домен, отделенный от связывающего целлюлозу домена линкером с богатой серином и треонином последовательностью, позволяет некоторым ксиланазам выступать в качестве группы уникальных белковых носителей

Оптимизация процесса внутриклеточного транспорта

Перед выделением наружу белки транспортируются между ER и тенденциями Гольджи через везикулы. В этом процессе грузовой рецептор ER-Гольджи рекрутирует секретируемые белки в везикулы, тем самым облегчая их транспортировку. Оптимизация процесса внутриклеточного транспорта белка позволяет повысить секрецию белка

- **Конструирование штамма с дефицитом протеазы**
- **Регуляция морфологии мицелия**
- **Регуляция Srebp**

Список литературы

- Karnaukhova, E., Ophir, Y., Trinh, L., Dalal, N., Punt, P. J., Golding, B., et al. (2007). Expression of human α 1-proteinase inhibitor in *Aspergillus niger*. *Microb. Cell Fact.* 6:34. doi: 10.1186/1475-2859-6-34
- М.А. Эльдаров, Н.В. Равин Центр «Биоинженерия»
РАН1https://portal.tpu.ru/SHARED/a/ALLYSY/academic/Tab4/pr10_dr.pdf
- Дешпанде, Н., Уилкинс, М. Р., Пакер, Н. и Невалайнен, Х. (2008). Пути гликозилирования белка в нитчатых грибах. *Гликобиология* 18, 626-637. doi: 10.1093/glycob /cwn044

Спасибо за внимание!

