



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.25

(51) Int. Cl. *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 15/75 (2006.01)

(21) Номер заявки
201600029

(22) Дата подачи заявки
2011.07.27

(54) РЕГУЛЯЦИЯ ИНДУЦИРУЕМЫХ ПРОМОТОРОВ

(31) 10171252.9; 11162420.1

(32) 2010.07.29; 2011.04.14

(33) EP

(43) 2016.05.31

(62) 201300189; 2011.07.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛОНЦА АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Венцель Мариан, Альтенбухнер
Йозеф (DE), Кицнак Кристоф (CH)**

(74) Представитель:
Пилишкина Л.С. (RU)

(56) TIANKI SUN: "Regulation des Mannose-Operons in Bacillus subtilis, Dissertation zur Erlangung der Würde eines Doktors in Naturwissenschaften", INTERNET CITATION, 16 April 2010 (2010-04-16), pages I-VI, XP002604428, Retrieved from the Internet:URL:http://elib.uni-stuttgart.de/opus/volltexte/2010/5249/pdf/Regulation_des_Mannose_Operons.pdf [retrieved on 2010-11-10], the whole document, in particular p. 3-4, 80-88, 123-127, fig. 4-1 and fig. 4-14

SUN TIANQI ET AL.: "Characterization of a mannose utilization system in Bacillus subtilis", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC; US, vol. 192, no. 8, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 2128-2139, XP002604427, ISSN: 0021-9193, DOI:DOI:10.1128/JB.01673-09 [retrieved on 2010-02-05], the whole document

TOBISCH STEFFEN ET AL.: "Regulation of the lic operon of Bacillus subtilis and characterization of potential phosphorylation sites of the LicR regulator

protein by site-directed mutagenesis", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 181, no. 16, August 1999 (1999-08), pages 4995-5003, XP002614551, ISSN: 0021-9193, the whole document, in particular fig. 4, table 4 and p. 5000 right-hand column

WILMS BURKHARD ET AL.: "High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the Escherichia coli rhaBAD promoter", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 73, no. 2, 20 April 2001 (2001-04-20), pages 95-103, XP002228440, ISSN: 0006-3592, the whole document, in particular Table I and paragraph bridging left and right column on p. 98

GÖRKE BORIS ET AL.: "Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients.", NATURE REVIEWS. MICROBIOLOGY AUG 2008 LNKD-PUBMED:18628769, vol. 6, no. 8, August 2008 (2008-08), pages 613-624, XP009142600, ISSN: 1740-1534, the whole document

DEUTSCHER ET AL.: "The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria", CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, GB, vol. 11, no. 2, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 87-93, XP022616728, ISSN: 1369-5274, DOI:DOI:10.1016/J.MIB.2008.02.007 [retrieved on 2008-03-21], the whole document

ABRANCHES JACQUELINE ET AL.: "Characterization of Streptococcus mutans strains deficient in EIIAB Man of the sugar phosphotransferase system", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 69, no. 8, 1 August 2003 (2003-08-01), pages 4760-4769, XP002558891, ISSN: 0099-2240, DOI:DOI:10.1128/AEM.69.8.4760-4769.2003

(57) Изобретение относится к получению гетерологических полипептидов в рекомбинантной бактериальной клетке-хозяине, при котором указанную рекомбинантную клетку-хозяина делают не способной деактивировать промотор, управляющий экспрессией указанного гетерологического полипептида в отсутствие индуктора.

Настоящее изобретение относится к получению гетерологических полипептидов в рекомбинантной бактериальной клетке-хозяине. В частности, данное изобретение относится к регуляции экспрессии гетерологической последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей этот полипептид, путём использования промотора, индуцируемого специфическим субстратом (индуктором). Более конкретно, данное изобретение относится к регуляции экспрессии гетерологического полипептида в бактериальной клетке-хозяине, при которой эту бактериальную клетку-хозяина делают не способной деактивировать промотор, управляющий экспрессией указанного гетерологического полипептида в отсутствие индуктора.

Уровень техники

Важным аспектом при получении гетерологических полипептидов в рекомбинантном микроорганизме является выбор промотора, используемого для управления экспрессией гетерологическими последовательностями нуклеиновых кислот, которые кодируют этот целевой полипептид.

Пригодный для этой цели промотор должен быть сильным, то есть вырабатывать соответствующую мРНК с высокой скоростью, позволяя вырабатывать большой объем полипептида. Кроме того, этот промотор должен легко подвергаться регуляции и запускать получение данного гетерологического полипептида только после индукции.

Однако существует сложность, заключающаяся в том, что обычно индуцирующий субстрат представляет собой питательное вещество для данного микроорганизма и потребляется этим микроорганизмом. Однако когда используемая для культивирования этого микроорганизма среда истощается в этом индуцирующем субстрате, то данный микроорганизм деактивирует этот промотор, и, таким образом, экспрессия целевого полипептида прекращается. Во избежание нежелательного прекращения экспрессии генов, этот индуктор должен добавляться в больших количествах и/или должен вводиться непрерывно. Потребность в значительных объемах индуктора повышает стоимость данного ферментационного процесса. Кроме того, является ограничением использование эффективных промоторов, которые при этом требуют дорогостоящих индукторов.

Таким образом, для получения рекомбинантных полипептидов желательны клетки-хозяева, у которых активность промотора, управляющего экспрессией гетерологических полипептидов, не зависит от присутствия этого индуктора, но у которых экспрессия этого гетерологического полипептида тем не менее может чётко регулироваться.

Заявка на патент WO 2006/133210 A2 относится к способу получения рекомбинантных пептидов в бактериальной клетке-хозяине с использованием промотора, индуцируемого маннитолом, арабитом, глюцитом или глицерином, при котором данную бактериальную клетку-хозяина делают не способной разрушать или метаболизировать названный индуктор. Согласно названному способу, ген или гены, кодирующие ферменты, требуемые для метаболизации данного индуктора, подвергаются генным модификациям или делециям в этом геноме, вследствие чего эта клетка не может осуществлять экспрессию, из своего генома, функционального фермента, необходимого для метаболизирования или разрушения данного индуктора. С целью обеспечения поглощения этого индуктора, не подвергаются модификации гены, относящиеся к переносу этого индуктора в данную клетку. Однако данный способ требует при этом добавления индуктора для катализа активации соответствующего промотора, управляющего экспрессией целевого полипептида. Наряду с этим, накопление индуктора в данной клетке может отрицательно влиять на развитие этой клетки.

Многие бактерии способны использовать различные источники углерода. При наличии смеси источников углерода выбирается тот источник углерода, который способствует наиболее быстрому росту (первичный источник углерода). Одновременно с этим, под воздействием явления, называемого углеродной катаболитной репрессией (CCR), происходит ингибирование функций, задействованных при использовании вторичных источников углерода.

Кроме CCR, те специфические катаболитные гены, которые задействованы в использовании менее предпочтительного вторичного источника углерода, подвергаются экспрессии только в присутствии указанного вторичного источника углерода. В результате экспрессия генов, задействованных в катаболизме вторичного источника углерода, зависит от присутствия указанного вторичного источника углерода (индукция), и от отсутствия первичного источника углерода (катаболитная репрессия).

Публикация авторов Tianqui Sun et al., "Описание системы по использованию маннозы в *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology*, American Society for Microbiology, vol. 192, April 1, 2010, стр. 2128-2139, относится к идентификации оперона маннозы и его генов, также как и промоторов PmanP и PmanR, регуляция которых осуществляется маннозой. Описано, что метаболизм маннозы зависит от системы фосфонолпируват: углеводная фототрансфераза и что оперон маннозы дополнительно зависит от катаболитной углеродной репрессии. Для описания и идентификации функции отдельных генов были приготовлены нокаут-мутанты, у которых отсутствуют соответствующие гены и, следовательно, у них отсутствуют соответствующие белки, кодируемые указанными генами. Было выявлено, что удаление гена-транспортёра маннозы manP приводило к конститутивной экспрессии как от промоторов PmanP и PmanR, что указывает на то, что переносчик маннозы ManP обладает негативным воздействием на регуляцию оперона маннозы, так и от гена manR, кодирующего маннозо-специфичный транскрипционный регулятор ManR.

Авторы Tobisch et al., "Регуляция *lic*-оперона у *Bacillus subtilis* и описание потенциальных сайтов фосфорилирования белка-регулятора LiR с помощью сайт-специфического мутагенеза", в *Journal of Bacteriology*, vol. 181, № 16, 19 августа 1999 г., страницы 4995-5003, сообщают, что обмен аминокислоты, связывающей фосфорил-группу, в области EIIA регулятора LicR другой аминокислотой приводит к активности регулятора мутанта LiCR при отсутствии индуцирующего субстрата.

Авторы Görke et al., "Катаболитная углеродная репрессия у бактерий: Множество путей получения максимума из питательных веществ" в *Nature Reviews. Microbiology*, vol. 6, № 8, август 2008 г., стр. 613-624, описывают штаммы-мутанты *Streptococcus*, у которых отсутствует транспортёр маннозы EIIAB, и влияние системы фосфоенолпируват : углеводная фосфотрансфераза. Показано, что транспортёр маннозы EIIAB не ограничен только фосфорилированием маннозы, но также и фосфорилирует глюкозу, фруктозу и 2-деоксиглюкозу. Наряду с этим, показано, что даже при отсутствии транспортёра маннозы EIIAB, манноза может забираться через специфический транспортёр фруктозы EII^{FRU}.

Авторы Deutscher et al., "Механизмы катаболитной углеродной репрессии у бактерий" (*Current Opinion in Microbiology*, *Current Biology LTD*, Великобритания, том 11, № 2, 1 апреля 2008 г., стр. 87-93) приводят общий обзор углеродной катаболитной репрессии в разных бактериях, например *E.coli* и *B.subtilis*.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении используются эти механизмы регуляции катаболизма углерода путём получения бактериальной клетки-хозяина, при этом промотор, регулирующий экспрессию генов, участвующих в метаболизме вторичного источника углерода, не деактивируется при отсутствии своего соответствующего источника углерода, и согласно настоящему изобретению данный промотор только находится под контролем углеродной катаболитной репрессии.

Согласно настоящему изобретению, используемый промотор - это промотор, который регулирует использование вторичного источника углерода данной бактериальной клетки-хозяина.

В присутствии первичного источника углерода этот промотор подвергается CCR. Когда в среде, используемой для культивирования рекомбинантной бактериальной клетки-хозяина, заканчивается первичный источник углерода или же концентрация первичного источника углерода падает ниже уровня, требуемого для CCR, CCR этого промотора больше не работает, и этот промотор автоматически начинает экспрессию генов, управляемых указанным промотором.

Настоящим изобретением обеспечивается получение рекомбинантной бактериальной клетки-хозяина, в соответствии с ним данная рекомбинантная бактериальная клетка-хозяин способна использовать больше одного источника углерода, в соответствии с ним в катаболизме углерода этих источников углерода данной бактериальной клетки-хозяина участвует система фосфоенолпируват: углеводная фосфотрансфераза (PTS) и CCR, в соответствии с ним данная бактериальная клетка-хозяин подвергается генетическим модификациям для предотвращения деактивации белка-регулятора транскрипции промотора, индуцируемого источником углерода, в отсутствие названного вторичного источника углерода, но под контролем CCR, в соответствии с ним данный источник углерода представляет собой вторичный источник углерода для данной бактериальной клетки-хозяина.

В соответствии с ещё одним аспектом настоящего изобретения, данная рекомбинантная бактериальная клетка-хозяин согласно настоящему изобретению трансформируется вектором, содержащим гетерологическую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую полипептид, оперативным путём связываемый с промотором, индуцируемым вторичным источником углерода, при этом данный промотор вектора управляется названным белком-регулятором транскрипции, для которого данная бактериальная клетка-хозяин была генетически модифицирована с тем, чтобы не быть подверженной деактивации в отсутствие конкретного соответствующего источника углерода.

Наряду с этим настоящее изобретение обеспечивает создание процесса приготовления гетерологических полипептидов путём культивирования рекомбинантной бактериальной клетки-хозяина согласно настоящему изобретению, трансформированной вектором, который содержит последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую этот полипептид.

Кроме того, настоящее изобретение относится к использованию рекомбинантной бактериальной клетки-хозяина согласно настоящему изобретению при получении гетерологических полипептидов.

В соответствии с одним конкретным аспектом, настоящее изобретение относится к режиму индукции генной экспрессии, требующему уменьшенное количество индуктора, и, в частности, при полном отсутствии индуктора. Согласно ещё одному специфическому аспекту, настоящее изобретение относится к системе экспрессии бактерий, пригодной для ферментации с высокой плотностью клеток.

В частности, предметом настоящего изобретения является способ получения гетерологического полипептида в рекомбинантной бактериальной клетке-хозяине, в котором используется рекомбинантная бактериальная клетка-хозяин, катаболизм источников углерода которой находится под контролем углеродной катаболитной репрессии и системы фосфоенолпируват: углеводная фосфотрансфераза, и которая генетически модифицирована так, что она не способна деактивировать белок-регулятор транскрипции, специфический для промотора, индуцируемого вторичным источником углерода при отсутствии индуцирующего вторичного источника углерода, и который содержит вектор с гетерологической последова-

тельностью нуклеиновых кислот, кодирующей полипептид, оперативным путём связываемый с промотором, который индуцируется этим вторичным источником углерода и регулируется этим белком-регулятором транскрипции, при этом указанный способ включает в себя этапы выращивания бактериальной клетки-хозяина в среде для культивирования: клеток, причём последняя не содержит данного индуцирующего вторичного источника углерода, а содержит иной источник углерода, индуцирующий экспрессию указанного полипептида этим иным источником углерода в момент времени, когда концентрация этого иного источника углерода падает ниже уровня, необходимого для углеродной катаболитной репрессии, и извлечение этого полипептида из этих клеток или из данной клеточной культуры.

В дополнение к этому, предметом настоящего изобретения являются рекомбинантные бактериальные клетки-хозяева, пригодные для осуществления способа, согласно настоящему изобретению.

Например, настоящее изобретение относится к рекомбинантной бактериальной клетке-хозяину, катаболизм источников углерода которой находится под контролем углеродной катаболитной репрессии и системы фосфоенолпируват: углеводная фосфотрансфераза, и которая генетически модифицирована таким образом, что она не способна деактивировать белок-регулятор транскрипции, специфический для промотора, способного индуцироваться вторичным источником углерода при отсутствии индуцирующего вторичного источника углерода путём удаления из генома указанной бактериальной клетки-хозяина того гена, который кодирует переносимый фосфорилгруппу фермент ЕП, специфичный к белку-регулятору транскрипции, и который содержит вектор с гетерологической последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей полипептид, оперативным путём связываемый с промотором, который регулируется этим белком-регулятором транскрипции, по отношению к которому данная бактериальная клетка-хозяин генетически модифицирована с тем, чтобы быть не способной к деактивации, и в которой в названный вектор встроен ген, кодирующий данный специфический белок-регулятор транскрипции.

Кроме того, предметом настоящего изобретения является рекомбинантная бактериальная клетка-хозяин, катаболизм источников углерода которой находится под контролем углеродной катаболитной репрессии и системы фосфоенолпируват: углеводная фосфотрансфераза, и которая генетически модифицирована таким образом, что она не способна деактивировать белок-регулятор транскрипции, специфический для промотора, способного индуцироваться вторичным источником углерода при отсутствии индуцирующего вторичного источника углерода путём генетической модификации генома указанной бактериальной клетки-хозяина того гена, который кодирует белок-регулятор транскрипции так, что этот белок-регулятор транскрипции, экспрессируемый указанным геном, не способен связывать фосфорилгруппу, переносимую ферментом ЕП, специфичным для указанного белка-регулятора транскрипции, и которая содержит вектор с гетерологической последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей полипептид, оперативным путём связываемый с промотором, который регулируется этим белком-регулятором транскрипции, по отношению к которому данная бактериальная клетка-хозяин генетически модифицирована так, чтобы быть не способной к деактивации и в которой в названный вектор дополнительно встроен модифицированный ген, кодирующий белок-регулятор транскрипции, не способный связывать фосфорил-группу, переносимую соответствующим ферментом ЕП.

В соответствии с ещё одним аспектом настоящее изобретение относится к способу получения гетерологического полипептида путём культивирования рекомбинантной бактериальной клетки-хозяина, при котором используется рекомбинантная бактериальная клетка-хозяин, катаболизм источников углерода которой находится под контролем углеродной катаболитной репрессии и системы фосфоенолпируват: углеводная фосфотрансфераза и которая генетически модифицирована таким образом, что она не способна метаболизировать индуцирующий источник углерода промотора, индуцируемого источником углерода, при котором данный индуцирующий источник углерода является вторичным источником углерода для данной бактериальной клетки-хозяина и которая содержит вектор с названным промотором, индуцируемым указанным вторичным источником углерода, и гетерологическую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую полипептид, оперативным путём связанный с этим промотором, при этом названный процесс представляет собой периодическое культивирование с подпиткой, при этом после этапа периодического культивирования запускают индукцию добавлением первой порции индуцирующего вторичного источника углерода с одновременным началом подачи второй порции.

Другие задачи и преимущества станут очевидными для специалистов в данной области техники при рассмотрении нижеследующего подробного описания со ссылкой на прилагаемые иллюстрирующие чертежи и на приложенную формулу изобретения.

В соответствии с вариантом осуществления, относящимся к вышеописанному, индукция экспрессии целевого полипептида не зависит от присутствия индуцирующего источника углерода для данного промотора. Таким образом, данный вариант осуществления особенно целесообразен в том, что не требуется индуцирующего источника углерода. Однако, с точки зрения экономичности, было бы полезным также, чтобы можно было уменьшить количество источника углерода, требуемое для индукции данного промотора.

Таким образом, согласно одному альтернативному решению предметом настоящего изобретения является способ получения целевого полипептида путём экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей указанный целевой полипептид, при котором данная экспрессия находится под контролем

промотора, индуцируемого источником углерода, при котором процесс катаболизма данного индуцирующего источника с помощью указанной бактериальной клетки-хозяина, которая будет трансформироваться с помощью вектора, несущего данный промотор и нуклеотидную последовательность целевого полипептида, прерывается или по крайней мере затягивается во времени.

Согласно настоящему изобретению данный альтернативный вариант реализуется путём удаления или генетического изменения, в геноме данной бактериальной клетки-хозяина, названной нуклеотидной последовательности, кодирующей специфическую изомеразу индуцирующего источника углерода, которая преобразует данный индуцирующий источник углерода после переноса в эту клетку, во фруктозо-6-фосфат. Изомеризация во фруктозо-6-фосфат - это первый этап в катаболизме источника углерода, как только данный источник углерода был перенесён в данную клетку. Прерывание или задержка во времени процесса изомеризации источника углерода означает, что этот источник углерода доступен для индукции в течение продолжительного периода времени. Таким образом, объём индуцирующего источника углерода может быть уменьшен.

В соответствии с одним примером, данный альтернативный вариант относится к индуцируемому промотору маннозы и к бактериальной клетке-хозяину для такого промотора, в котором в геноме данной бактериальной клетки-хозяина был удалён или генетически модифицирован ген, кодирующий маннозо-6-фосфат-изомеразу, также называемую ManA, вследствие чего изомеризация маннозы, после её переноса в данную клетку, невозможна или по крайней мере затягивается во времени.

Краткое описание чертежей

На нижеследующих фигурах изображено:

фиг. 1 - схематически структура оперона маннозы с размещением и ориентацией соответствующих генов и промоторов, и их активация с помощью ManR, указываемого стрелками;

фиг. 2 - технологическая схема катаболизма маннозы с переносом в данную клетку, фосфорилирование маннозы в маннозо-6-фосфат во время переноса и преобразования во фруктозо-6-фосфат;

фиг. 3 - последовательность нуклеиновых кислот промоторной области manP, включающей часть промотора manR;

фиг. 4 - последовательность нуклеиновых кислот промоторной области *B.subtilis*, включающей в себя промотор manR;

фиг. 5 - последовательность нуклеиновых кислот у *B.subtilis*, используемую в векторе промотора-зонда pSUN272.1 для изучения индуцируемости и катаболитной репрессии промотора manP маннозой и глюкозой и определения сайта связывания ManR;

фиг. 6 - последовательность нуклеиновых кислот промоторной области, включающей промотор manR, с выделенным сайтом инициации транскрипции;

фиг. 7 - плазмидная карта вектора экспрессии pSUN279.2;

фиг. 8 - β -галактозидазная активность *B.subtilis* 3NA, содержащей плазмиды pSUN279.2, pSUN284.1 и pSUN291 соответственно;

фиг. 9 - β -галактозидазная активность *B.subtilis* 3NA, содержащей плазмиду pSUN284.1, так же как и другие плазмиды, содержащие фрагменты различной длины последовательности нуклеиновых кислот, показанной на фиг. 5;

фиг. 10 - β -галактозидазная активность *B.subtilis* 3NA, содержащей векторы pSUN291, pSQN385.2 и pSUN386.9 с последовательностями нуклеиновых кислот, как изображено на фиг. 4;

фиг. 11 - плазмидная карта вектора экспрессии pMW168.1;

фиг. 12 - плазмидная карта инсерционного вектора pSUN356.7 (Δ manP);

фиг. 13 - диаграмма, отображающая в логарифмическом виде концентрацию сухой биомассы, представленную в течение всего периода ферментации *B.subtilis* TQ356/pMW168.1 (Δ manP-мутант), и сигнал флуоресценции (RFU), отображенный в виде кривой в течение всего процесса;

фиг. 14 - изображение содержания додецилсульфата натрия при электрофорезе в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) клеточных проб, взятых при ферментации с *B.subtilis* TQ356/pMW168.1, и

фиг. 15 - технологическая карта с получением плазмиды pMW168.1

Подробное описание изобретения

Нижеследующие определения понятий, используемых здесь, представлены в целях облегчения понимания настоящего изобретения.

"Фермент ЕП", "ЕП" или "переносчик" относятся к пермеазе, специфичной к источнику углерода системы фосфоенолпируват: углеводная фосфотрансфераза (PTS), которая катализирует транспорт и сопутствующее фосфорилирование этого источника углерода.

Система PTS содержит ряд ферментов ЕП, каждый из которых является специфическим для определённого источника углерода, например, какого-то вида сахара.

Ферменты ЕП представляют собой комплексные соединения, обычно состоящие из трёх областей А, В и С, и иногда из четвёртой области D, в которых ЕПА и ЕПВ участвуют в фосфорилировании соответствующего источника углерода, а мембранная граница ЕПС (ЕПД, если таковая присутствует) является медиатором перехода этого конкретного источника углерода в данную клетку.

При отсутствии этого специфического источника углерода соответствующий фермент ЕПА и в некоторых случаях ЕПВ деактивируют соответствующий белок-регулятор транскрипции, специфичный к углеродному источнику, путём переноса фосфорилгрупп к соответствующим сайтам фосфорилирования, имеющимся в относящемся к ним белке-регуляторе транскрипции - в зависимости от области ЕП-ЕПА и ЕПВ, соответственно.

"Белок-регулятор транскрипции" или "регулятор" положительно регулирует (т.е. активирует) катаболитный оперон (опероны) этого специфического источника углерода. Белки-регуляторы транскрипции обычно содержат две сохраняющиеся регуляторные области, которые могут подвергаться фосфорилированию (регуляторные области PTS или фосфорилируемые регуляторные области PRD). Кроме того, некоторые белки-регуляторы дополнительно содержат сайты дальнейшего фосфорилирования, относящегося к ЕПА и ЕПВ. В зависимости от белка-регулятора транскрипции этот белок-регулятор транскрипции деактивируется переносом фосфорилгруппы из фермента П в один или более из вышеуказанных фосфорилсвязывающих сайтов в области ЕПА и ЕПВ и/или PRDI и активируется переносом фосфорилгруппы из белка гистидина (HPr) в область PRDII. Все эти различные белки-регуляторы транскрипции, специфичные к источнику углерода, из системы PTS могут являться активаторами или антитерминаторами.

"Вектор, способный к экспрессии в хозяине" или "вектор экспрессии" - это конструкция на основе полинуклеиновых кислот, получаемая рекомбинантным путём или в результате синтеза, с целым рядом указанных элементов полинуклеиновых кислот, которые позволяют транскрипцию конкретной последовательности нуклеиновых кислот в клетке-хозяине. Обычно этот вектор включает в себя транскрипционную единицу, содержащую подлежащую транскрипции специфическую последовательность нуклеиновых кислот, оперативным путём связываемую с промотором. Вектор, способный к экспрессии в хозяине, может, например, представлять собой плазмиду с автономной репликацией или с саморепликацией, космиду, фаг, вирус или ретровирус.

Термины "трансформация", "трансформированный" или "вводящий нуклеиновую кислоту в клетку-хозяина" обозначают любой процесс, в котором внеклеточная нуклеиновая кислота, такая как вектор, с сопровождающим материалом или без него, входит в клетку-хозяина.

Трансформация соответствующих клеток-хозяев, например, с вектором экспрессии, может проводиться хорошо известными способами, такими как микроинъекция, электропорация, бомбардировка частицами, или химическими методами, такими как опосредованная через фосфат кальция трансформация, и с помощью природных систем трансформации, описанных, например, в работах авторов Maniatis et al., Молекулярное клонирование, Лабораторный учебник, Лаборатория Cold Spring Harbor (1982 г.) или авторов Ausubel et al., Рабочие протоколы в молекулярной биологии, изд. John Wiley and Sons (1984 г.).

"Гетерологическая последовательность нуклеиновых кислот" или "последовательность нуклеиновых кислот, гетерологическая к хозяину" обозначают последовательность нуклеиновых кислот, которая кодирует, например, продукт экспрессии, такой как полипептид, который является чужим для данного хозяина, "гетерологическая экспрессия" или "гетерологический продукт", т.е. последовательность нуклеиновых кислот, источником которой является донор, отличный от данного хозяина, или химически синтезированная последовательность нуклеиновых кислот, которая кодирует, например, такой продукт экспрессии, как полипептид, который является чужеродным для этого хозяина. В случае, если хозяин представляет собой конкретную прокариотную разновидность, указанная гетерологическая последовательность нуклеиновых кислот предпочтительно происходит от иного рода семьи, и более предпочтительно от иного отряда или класса, в частности, от иного типа раздела, и наиболее предпочтительно от иной области (империи) организмов.

Гетерологическая последовательность нуклеиновых кислот, происходящая от донора иного, чем данный хозяин, может быть модифицирована перед её введением в данную клетку-хозяина путём мутаций, инсерции, делеции или замещений одиночных нуклеиновых кислот или части данной гетерологической последовательности нуклеиновых кислот до тех пор, пока такие модифицированные последовательности не будут демонстрировать ту же самую функцию (функциональный эквивалент), что и эталонная последовательность. Гетерологическая последовательность нуклеиновых кислот, как она понимается в данном описании, включает в себе и нуклеиновые последовательности, происходящие от иной области (империи) организмов, например, от эукариотов (эукариотной природы), такой, например, как человеческие антитела, которые были использованы в библиотеке рисунков фагов и у которых одиночные нуклеиновые кислоты или часть данных последовательностей нуклеиновых кислот были модифицированы в соответствии с "правилами использования кодонов" прокариотного хозяина.

"Гетерологический полипептид" или "целевой полипептид" в рамках смысла настоящего изобретения могут представлять собой гетерологический белок, происходящий от человека, млекопитающего или прокариота. Другие белки - это антигены, такие как гликопротеины и углеводы от микробных патогенов, как вирусных, так и антибактериальных, и от новообразований. Другими гетерологическим полипептидами являются такие ферменты, как химозин, протеазы, полимеразы, дегидрогеназы, нуклеазы, глюканы, оксидазы, альфа-амилаза, оксидоредуктазы, липазы, амидазы, нитрил-гидратазы, эстеразы или нитрилазы.

"Источник углерода" относится к источнику углерода, обычно углеводу, который может отбираться

и метаболизироваться бактериальной клеткой и который подвергается воздействию системы PTS и углеводной катаболитной репрессии (CCR), типичными примерами углеводов являются сахара и производные сахаров.

Многие бактерии могут использовать более одного углевода в качестве источника углерода и энергии. Благодаря использованию специфических внеклеточных ферментов, такие бактерии как *Bacilli*, способны разлагать несколько полисахаридов, которые присутствуют в значительном объеме в растительной биомассе. Получаемые в результате олиго-, ди- или моносахариды переносятся в эту клетку и далее перерабатываются. Обычно эти катаболитные ферменты, задействованные в метаболизме или разложении сахаридов, синтезируются только в присутствии этого специфического субстрата в культуральной среде, а предпочтительные источники углерода и энергии отсутствуют. Предпочтительный путь для транспорта углеводов для переноса углеводов через мембрану клетки бактерии - это PTS.

В системе PTS транспорт углевода сквозь эту мембрану и последующее фосфорилирование осуществляются через посредство фермента, специфичного к указанному углеводу, относящемуся к ферменту II (ЕII). Так как ЕII служит медиатором при переносе его соответствующего источника углерода в клетку, то ЕII также называют "переносчиком".

В присутствии смеси углеводов клетки селективно отбирают тот источник углерода, который обеспечивает их максимальной энергией и преимуществом роста (первичный источник углерода). Одновременно они подавляют разнообразные функции, задействованные в этом катаболизме, и отбор из этих менее предпочтительных источников углерода (вторичный источник углерода).

Обычно первичный источник углерода для большинства бактерий - это глюкоза, и в зависимости от бактерии, различные сахара и производные Сахаров используются в качестве вторичных источников углерода. Однако первичный источник углерода также может представлять собой иное соединение. Например, в случае псевдомонад, первичным источником углерода может являться ароматическое соединение.

Вторичные источники углерода включают, например, маннозу, лактозу и мелибиозу, без ограничения этими последними.

В системе PTS все эти разнообразные катаболитные гены, участвующие в метаболизме этого специфического источника углерода, управляются белками-регуляторами транскрипции. Эти белки-регуляторы транскрипции могут действовать как антитерминаторы, и они активны только в присутствии специфического источника углерода (индуктора). Было выявлено, что ЕII оказывает отрицательное (деактивирующее) действие на свой соответствующий белок-регулятор транскрипции в результате переноса фосфорилгрупп в специфический сайт связывания, присутствующий в этом белке-регуляторе транскрипции.

При отсутствии первичного источника углерода и при наличии промотора, специфичного к индуцирующему источнику углерода, этот промотор активируется его соответствующим белком-регулятором транскрипции, и происходит экспрессия генов, находящихся под контролем этого промотора. При отсутствии индуцирующего источника углерода белок-регулятор транскрипции, регулирующий этот промотор, деактивируется переносом фосфорилгруппы из его ЕII на этот соответствующий сайт связывания на белке-регуляторе транскрипции, деактивируя таким образом этот промотор и прекращая экспрессию генов, находящихся под контролем указанного промотора.

Иным образом, при наличии предпочтительного первичного источника углерода - независимо от наличия или отсутствия менее предпочтительных вторичных источников углерода - экспрессия катаболитных генов указанных вторичных источников углерода подавляется с помощью CCR.

В общем, настоящее изобретение основано на ингибировании регуляции белка-регулятора транскрипции, специфичного к этому углеродному источнику при отсутствии указанного специфичного источника углерода. В частности, настоящее изобретение основано на предотвращении репрессии или деактивации переносом фосфорилгруппы через соответствующий фермент ЕII к белку-регулятору транскрипции.

Если предотвращается репрессия белка-регулятора транскрипции, специфичного к источнику углерода, то промотор, для которого данный белок-регулятор транскрипции является активатором, будет действовать, независимо от наличия источника углерода, являющегося индуктором для данного промотора. Таким образом, для экспрессии гена, находящегося под контролем такого промотора, не требуется индуцирующего источника углерода, и в дальнейшем процесс экспрессии этого гена будет непрерывным.

Из вышеизложенного следует, что в настоящем изобретении используется промотор, индуцируемый вторичным источником углерода, когда этот промотор находится под контролем системы PTS с одной стороны и с помощью CCR, с другой стороны.

В соответствии с этим целью настоящего изобретения является предотвращение деактивации индуцируемого источником углерода промотора, используемого в качестве промотора в экспрессии целевого полипептида, путём предотвращения деактивации белка-регулятора транскрипции, специфичного к указанному промотору.

Согласно первому подходу, данная цель достигается прерыванием фосфорилирования белка-

регулятора транскрипции его специфичным ферментом ЕП путём лишения способности связывания с указанной фосфорил-группой по крайней мере одного сайта связывания этого белка-регулятора транскрипции для фосфорил-группы, переносимой ферментом ЕП.

С этой целью в геноме данной бактериальной клетки-хозяина можно подвергнуть генетической манипуляции ген, кодирующий этот белок-регулятор транскрипции, в результате чего этот ген будет обеспечивать экспрессию белка-регулятора транскрипции, который не способен связывать фосфорил-группу, переносимую из фермента ЕП.

В соответствии со вторым подходом фосфорилирование прерывается путем удаления из генома этой бактериальной клетки-хозяина гена, кодирующего фермент ЕП, т.е. фермента, регулирующего активность белка-регулятора транскрипции.

Согласно настоящему изобретению экспрессия гетерологического полипептида устанавливается под контроль промотора, который является специфичным к вышеописанному белку-регулятору транскрипции, для которого генетической модификацией бактериальной клетки-хозяина предотвращается деактивация переносимой фосфорилгруппы через фермент ЕП.

Настоящее изобретение обеспечивает получение целесообразной системы выработки гетерологических полипептидов путём ферментации рекомбинантной бактериальной клетки-хозяина согласно настоящему изобретению, трансформируемой вектором, содержащим гетерологическую нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный полипептид, оперативным путём связываемый с промотором, индуцируемым источником углерода, при этом данный промотор является активным даже при отсутствии индуцирующего источника углерода в данной ферментационной среде. Так как этот промотор, контролирующий экспрессию последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей целевой полипептид, всё ещё находится под контролем углеродной катаболитной репрессии, то никакой экспрессии не происходит в присутствии первичного источника углерода, такого как глюкоза, однако индукция завершается автоматически, когда в этой системе иссякнет первичный источник углерода (автоиндукция). Так как активность промотора, контролирующего экспрессию этого гетерологического полипептида, не зависит от наличия индуцирующего источника углерода, в ферментационной среде индукция экспрессии целевого полипептида достигается без необходимости в индуцирующем источнике углерода.

Настоящее изобретение выгодно в том отношении, что указанные рекомбинантные бактериальные клетки-хозяева можно выращивать до высокой плотности клеток в присутствии их первичного источника углерода, и как только будет достигнута необходимая плотность клеточной массы, автоматически запускается выработка целевых полипептидов при запуске катаболитной углеродной репрессии промотора, контролирующего экспрессию.

Ещё одним преимуществом настоящего изобретения является то, что при доливном периодическом культивировании во время фазы периодического культивирования выработка целевого полипептида не происходит или почти не происходит, то есть имеет место мощная катаболитная репрессия.

Подходящими для данного изобретения бактериальными клетками-хозяевами являются такие, которые могут использовать более одного источника углерода, при этом использование этих различных источников углерода происходит при углеродной катаболитной репрессии, а транспорт источника углерода сквозь клеточную мембрану и её фосфорилирование находятся под воздействием системы фосфонолпируват: углеводная фосфотрансфераза.

Бактериальные клетки-хозяева для настоящего изобретения могут быть грамположительными или грамтрицательными бактериями. Предпочтительными примерами являются те, которые относятся к phylum Firmicutes, и, в частности, те, которые принадлежат классу Bacilli. Специфическими примерами являются примеры рода *Bacillus*, такие как *B.subtilis*, *B.amyloliquifaciens*, *B.licheniformis*, *B.natto*, *B.megaterium*, и т.д., другие предпочтительные примеры включают в себя также *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Escherichia* или другой вид *Enterobacteria*, без ограничения вышеприведёнными.

Обычно Firmicutes являются грамположительными и имеют низкое содержание GC. Под "низким содержанием GC" понимается, что меньше 52% этих базовых пар в геноме бактерии являются парами GC. Например, грамположительные бактерии, такие как *Bacillus* и *Clostridium*, содержат 40% или меньше пар GC в этом геноме.

Ещё подходящими бактериальными клетками-хозяевами являются брюшные бактерии, такие как принадлежащие к отряду *Enterobacteriales*. Примерами таких брюшных бактерий являются те, которые относятся к грамтрицательным, как, например, рода *Escherichia*. Конкретными примерами являются штаммы *E.coli*, такие как TGI, W3110, DH1, XL 1-Синий и *Origami*.

E.coli и брюшные бактерии содержат примерно 50% содержания GC в геноме и поэтому они являются организмами с низким содержанием GC.

Грамположительные и грамтрицательные организмы определяются в соответствии с хорошо известной процедурой окрашивания по Грамму. Грамположительные организмы - это такие, которые имеют фиолетовый цвет под стандартным окрашиванием по Грамму. Грамтрицательные организмы содержат контрастный краситель, а не этот первичный краситель по Грамму.

Существуют разные механизмы CCR в Firmicutes и в брюшных бактериях, которые были интенсивно изучены в *Bacillus subtilis* и *E.coli* в качестве организмов-моделей (приводится ссылка, например, на

J.Stülke et al., "Регуляция катаболизма углерода в *Bacillus species*", *Annu. Rev. Microbiol.* (2000) 54: 849-880; Görke B. et Stülke. J., "Углеродная катаболитная репрессия в бактериях: многочисленные пути получения максимума из питательных веществ", *Nat. Rev. Microbiol.* (2008) 6: 613-624; Gosset G. et al., "Транскриптомный анализ Ccp-зависимого катаболитного контроля экспрессии генов в *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.*, (2004) 186: 3516-3524, Martinez-Antonio A. et al., "Идентификация глобальных регуляторов в транскрипционных регуляторных сетях в бактериях" *Curr. Opin. Microbiol.* (2003) 6: 482-489). Хотя общий механизм CCR и различен, но результат такой же, в частности в том, что в присутствии первичного источника углерода репрессируются все различные катаболитные опероны, участвующие в отборе и фосфорилировании вторичных источников углерода.

Рекомбинантная бактериальная клетка-хозяин согласно настоящему изобретению подвергается генетической модификации для предотвращения репрессии индуцируемого источником углерода промотора, управляющего экспрессией гетерологической последовательности нуклеиновых кислот, путём ингибирования деактивации специфичного промотору белка-регулятора транскрипции при отсутствии указанного индуцирующего источника углерода.

Таким образом, в рекомбинантной бактериальной клетке-хозяине согласно настоящему изобретению индуцируемый источником углерода промотор, управляющий экспрессией гетерологической последовательности нуклеиновых кислот, испытывает только углеродную катаболитную реPRESSION. В присутствии первичного источника углерода экспрессия этого гетерологического полипептида подавляется от CCR.

Согласно настоящему изобретению промотор, индуцируемый источником углерода, находится в своём активном состоянии, вне зависимости от наличия индуцирующего источника углерода, если только углеродная катаболитная репрессия не будет стимулироваться более предпочтительным первичным источником углерода.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает получение гетерологического полипептида без необходимости иметь индуктор для индуцирования промотора, управляющего геном (генами), кодирующим(и) этот полипептид.

В общем, для данного изобретения подходят такие промоторы, которые находятся под воздействием системы PTS и CCR в бактериальных клетках. В частности, соответствующие транскрипционные белки-регуляторы являются активаторами или антитерминаторами для катаболитного оперона, находящегося под управлением названных промоторов. Такие промоторы известны в данной области техники. Примеры промоторов, пригодных для данного изобретения, приведены в нижеследующей таблице со ссылкой на соответствующий оперон:

Оперон	Регулятор а)	Тип б)	Индуктор	Организм
<i>sacPA</i>	SacT	АТ	сахароза	<i>B.subtilis</i>
<i>sacB</i>	SacY	АТ	Сахароза	<i>B.subtilis</i>
<i>bglPH</i>	LicT	АТ	β-глюкозиды	<i>B.subtilis</i>
<i>licBCAH</i>	LicR	А	олиго-β-глюкозиды	<i>B.subtilis</i>
<i>levDEFG sacL</i>	LevR	А	фруктоза	<i>B.subtilis</i>
<i>mtAD</i>	MtlR	А	манит	<i>B.subtilis</i>
<i>manPA-yjdF</i>	ManR	А	манноза	<i>B.subtilis</i>
<i>manR</i>	ManR	А	манноза	<i>B.subtilis</i>
<i>bglFB</i> <i>bglG</i>	BglG	АТ	β-глюкозиды	<i>E.coli</i>
<i>lacTEGF</i>	LacT	АТ	лактоза	<i>L.casei</i>

а: белок-регулятор транскрипции

б: А: активатор

АТ: антитерминатор

Далее настоящее изобретение более подробно поясняется со ссылкой на оперон маннозы *B. subtilis*.

B.subtilis может использовать множество различных моно- или дисахаридов в качестве источников углерода, таких как глюкоза, мальтоза, сахароза, манноза, маннит и фруктоза. Эти сахара отбираются системой PTS. Транспорт в клетку и фосфорилирование проводятся опосредованно через фермент EII, специфичный соответствующему сахариду.

Как и во многих бактериях предпочтительным источником углерода у *B.subtilis* является глюкоза. В присутствии глюкозы потребление другого сахара в рамках системы PTS подавляется через CCR.

Структура оперона маннозы показана на фиг. 1, а транспорт маннозы в клетку и её катаболизм - на фиг. 2. Оперон маннозы у *B.subtilis* содержит три катаболитных гена (Kunst F.N. et al., "Полная последовательность генома грамположительной бактерии *B.subtilis*", *Nature* (1997) 390:249-256).

Первый ген - *manP*, кодирует специфичный маннозе фермент EII, относящийся к ManP. ManP осу-

ществляет перенос маннозы сквозь мембрану и одновременно с этим фосфорилирование маннозы до маннозо-6-фосфата. Второй ген - *manA* кодирует маннозо-6-фосфатизомеразу, которая преобразует маннозо-6-фосфат в соответствующий фруктозо-6-фосфат. Функция третьего гена - *yjdF* пока ещё не известна. Выше по потоку и при одинаковой ориентации этих трёх генов размещён регуляторный ген *manR*, который кодирует белок-регулятор транскрипции, относящийся к *ManR*.

Оперон маннозы является положительно регулируемым катаболитным опероном, и он управляется двумя разными промоторами. Один промотор - промотор *manR* (*PmanR*) отвечает за белок-регулятор транскрипции *ManR*. Второй промотор - промотор *manP* (*PmanP*) отвечает за транскрипцию генов *manP-manA-yjdF* (совместно называемых "*manPA-yjdF*"). В присутствии маннозы и при отсутствии глюкозы *ManR* связывается с *PmanP* и активирует экспрессию *manPA-yjdF*. Удивительным образом было выявлено, что *ManR* является не только белком-регулятором транскрипции для промотора *manPA-yjdF*, но и является авторегулятором для самого *manR*.

На фиг. 3 схематически изображена структура белка-регулятора транскрипции *ManR* и потенциальных сайтов фосфорилирования. Как изображено, *ManR* содержит две PRD (регуляторные области PTS), одну область ЕПА и область ЕПВ, также как и НТН (Область Спираль-виток-Спираль). Области PRD сохраняют регуляторные области, присутствующие в белках-регуляторах транскрипции, которые могут фосфорилироваться в ходе катаболизма углерода. Области ЕПА и ЕПВ представляют собой сайты связывания фосфорилгруппы, переносимой через *ManP*, область ЕП - переносчик оперона маннозы. Область НТН представляет собой структурный мотив в белке, способном связывать ДНК.

В отсутствие индуктора маннозы ЕПА и ЕПВ и, возможно, область PRDI от *ManR* фосфорилируется с помощью *ManP*, специфичного к маннозе фермента ЕП оперона маннозы, и таким образом теряет свою активность.

Следовательно, согласно первому подходу настоящего изобретения предотвращается деактивация *ManR* при отсутствии индуктора, т.е. маннозы, если сайты фосфорилирования в ЕПА и/или ЕПВ у *ManR* модифицируются или эти области удаляются, в результате чего он не может принимать фосфорилгруппу.

С этой целью ген *manR* в геноме бактериальной клетки-хозяина подвергается генетической модификации путём удаления или изменения соответствующей последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей соответствующий сайт (сайты) фосфорилирования в *ManR*.

Далее, согласно второму подходу настоящего изобретения деактивация промотора оперона маннозы предотвращается прерыванием переноса маннозы, что может быть осуществлено делецией или инактивацией гена, кодирующего *ManP*, в геноме этой бактериальной клетки-хозяина.

Эти изменения могут выполняться путём изменения или делеции, в данной бактериальной клетке-хозяине, кодирующей последовательности генов, кодирующих белки, участвующие в фосфорилировании белка-регулятора транскрипции, в данном случае, в опероне маннозы, *manR* и/или *manP*.

Такие генетически изменённые, "выведенные из строя" клетки-хозяева могут быть получены в соответствии с любым из разнообразных известных методов в данной области техники для такой цели. Например, гомологические рекомбинантные векторы, содержащие гомологические генные последовательности-мишени 5' и 3' мишеневой последовательности делеции нуклеиновых кислот, могут быть трансформированы внутрь клетки-хозяина. После гомологической рекомбинации может быть получена необходимая модифицированная клетка.

Методы модификации генов хорошо известны в данной области техники. Например, инактивация гена инсерцией полинуклеотида была описана, например, в работе авторов Röder D.L et al., "Мутагенез с обменом маркера гена изофермента пектатлазы в хризантеме Эрвиния", J. Bacteriol. (1985) 164 (1:51-56). Специфические мутации или делеции в гене могут быть выполнены с использованием, например, кассетного мутагенеза, как описано в работе авторов Wells J.A. et al., "Кассетный мутагенез: эффективный метод генерирования многочисленных мутаций в определённых сайтах", Gene (1985) 34 (2-3): 315-323; посредством которого в выбранном участке гена выполняются прямые или произвольные мутации, а затем они вводятся в хромосомную копию этого гена путём гомологической рекомбинации.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что промоторы, регулирующие оперон маннозы, в частности, *PmanR* и *PmanPA-yjdF*, представляют собой сильные промоторы, которые, таким образом, являются многообещающими кандидатами для получения гетерологических полипептидов. Однако, манноза - источник углерода, индуцирующий эти промоторы, является дорогостоящим сахаром, который пока ещё сужает использование промоторов, индуцируемых маннозой.

Так как согласно настоящему изобретению для экспрессии гетерологического полипептида в бактериальной клетке-хозяине не требуется индуцирующего источника углерода для начала экспрессии, а также использование промоторов, таких как промоторы маннозы, что обеспечивает конкурентоспособность не только с точки зрения прочности, но и стоимости.

Таким образом, настоящее изобретение относится также к использованию промоторов оперона маннозы *PmanR* и *PmanPA-yjdF* в качестве промотора для управления гетерологической последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей целевой полипептид в данной рекомбинантной бактериальной клетке-хозяине согласно настоящему изобретению.

Последовательность нуклеиновых кислот от *B.subtilis*, содержащая промоторную область промотора *manP*, как это используется в различных векторах экспрессии, таких как pSUN284.1, отображается на фиг. 5 с выделенным шрифтом сайтом инициации транскрипции на адениннуклеотиде, при этом блоки -35 и -10 курсивом и жирным шрифтом, а конец *manR* отмечен стрелкой, и сайты рестрикции *BglII*, *XbaI*, *AflII*, *NdeI* и *NruI* подчёркнут. Показан стартовый кодон информационного гена *IacZ*.

Последовательность нуклеиновых кислот, полученная от *B.subtilis*, содержащая промоторную область промотора *manR*, показана на фиг. 4, с выделенным сайтом инициации транскрипции, при этом блоки -10 и -35 представлены курсивом и жирным шрифтом, начало гена *manR* показано стрелкой, и сайты рестрикции *HindIII* приведены жирным шрифтом и подчёркнуты, а предполагаемая последовательность *сге* подчёркнута.

Под "промоторными областями оперона маннозы" понимают промоторные области, которые регулируют экспрессию *manPA-yjdF*, также как и *manR*, с участием или без участия последовательности *сге*.

"Промотор *manPA-yjdF*", как это приводится в данном описании, состоит главным образом из области -35, области -10 (блок Прибнова), сайта инициации транскрипции и сайта связывания *ManR*.

"Промотор *manR*", как это приводится в данном описании, состоит главным образом из области -35, области -10, сайта инициации транскрипции и сайта связывания *ManR* и, возможно, из последовательности *сге*.

Последовательность *сге* (катаболитный репрессивный элемент) представляет собой длинную последовательность ДНК с 14 нуклеотидами, с которой связывается *СсрА* (катаболитный белок управления А), являющийся общим белком-регулятором ССР у Firmicutes. Механизм катаболитной репрессии и активация в *B.subtilis* показаны на фиг. 6. Путём связывания *СсрА*, переводимого в комплексное соединение с помощью *Serin-46* фосфорилированного гистидинового белка *НPr* с последовательностью *сге*, этот промотор репрессируется. Это второй механизм катаболитной репрессии оперона маннозы. С помощью этого механизма экспрессия гена-регулятора *manR* подавляется в присутствии глюкозы. В результате это ингибирует активацию промотора *manP*. В присутствии глюкозы клетки отбирают глюкозу через *PtsG*, представляющую собой PTS-зависимую систему переноса, сходную с транспортёром маннозы *ЕII*. В этой клетке промежуточные соединения фруктозо-6-фосфат (*Fru-6-P*) и фруктозо-1,6-бифосфат (*Fru-1,6-DP*) накапливают и стимулируют *НPr*-киназу. *НPr*-киназа (*НPrk*) фосфорилирует *НPr* на *Serin-46*. *Ser-46-НPr* образует комплексное соединение с ДНК-связывающим белком *СсрА*, который связывается с так называемыми сайтами *сге*, присутствующими во многих катаболит-репрессируемых и катаболит-активируемых промоторами *B.subtilis*. Находится ли сайт *сге* в прямом направлении последовательности промотора -10, или перекрывает эту последовательность -10, связывание комплексного соединения *Ser-46-НPr/СсрА* ингибирует экспрессию от этого промотора. Эта ситуация выявлена на промоторе *ManR* (фиг. 4).

Последовательность нуклеиновых кислот, содержащая промоторную область *ManPA-yjdF*, предпочтительно содержит последовательность нуклеиновых кислот с фигуры 5 от *bp-80* до иницирующего кодона у *IacZ* (последовательность № 1), и более предпочтительно последовательность нуклеиновых кислот с фигуры 5 от *bp-80* и включая *bp-1*, т.е. выше в обратном направлении относительно сайта инициации транскрипции А в точке *bp+1* (последовательность № 2).

Последовательность нуклеиновых кислот, содержащая промоторную область *manR*, предпочтительно содержит последовательность нуклеиновых кислот с фигуры 4 от *bp-122* до иницирующего кодона у *manR* (последовательность № 3), более предпочтительно последовательность нуклеиновых кислот с фигуры 4 от *bp-122* и *bp+7*, т.е. включая предположительную последовательность *сге* (последовательность № 4), и, в частности, последовательность нуклеиновых кислот с фигуры 4 от *bp-122* и *bp-1*, т.е. в обратном направлении относительно сайта инициации транскрипции G в точке *bp+1* (последовательность № 5). Промоторные области как *manP*, так и *manR* содержат сайт связывания для белка-регулятора транскрипции *ManR* (на фиг. 4 обозначен как *IRI-R*, а на фиг. 5 как *IRI-P*), который представляет собой активатор транскрипции для промоторов оперона маннозы.

В соответствии с ещё одним аспектом настоящее изобретение относится к такой генетически модифицированной бактериальной клетке-хозяину, содержащей вектор с последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей необходимый полипептид, оперативным путём связываемый с промотором, индуцируемым от источника углерода, в которой промотор этого вектора регулируется белком-регулятором транскрипции, для которого данная бактериальная клетка-хозяин до этого была генетически модифицирована для исключения возможности её деактивации при отсутствии источника углерода, специфичного для указанного белка-регулятора транскрипции.

Что касается вышеупомянутого оперона маннозы, то промотором этого вектора может быть, например, *PmanP* или *PmanPA-yjdF*, любой из последовательностей от номера 1 до 5, так же, как и любым элементом из вышеприведённой таблицы.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения, в вектор, используемый в настоящем изобретении, может быть введён этот генетически модифицированный ген, кодирующий соответствующий белок-регулятор транскрипции, не способный связывать фосфорилгруппу, переносимую соответствующим *ЕII*. В результате в данной рекомбинантной бактериальной клетке-хозяине этот белок-

регулятор транскрипции не только экспрессируется этим хромосомным геном, но и соответствующим геном, интегрированным в этот вектор, что приводит к более высокой концентрации белка-регулятора транскрипции и к улучшению индукции. Например, когда промотор этого вектора является промотором оперона маннозы, то ген *manR* может быть интегрирован в этот вектор, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая область ЕП, была подвергнута делеции (*manRAEIIA*).

Вектором, подходящим для настоящего изобретения, предпочтительно является автономно или самостоятельно реплицирующаяся плазида, космида, фаг, вирус или ретровирус. Для настоящего изобретения может быть применено широкое разнообразие комбинаций хозяин/вектор.

Полезные экспрессирующие векторы, например, могут состоять из сегментов хромосомных, нехромосомных и/или синтетических последовательностей нуклеиновых кислот.

Подходящие векторы включают векторы со специфическим диапазоном хозяев, такие как векторы, специфичные, например, к *B. subtilis* и *E. coli* соответственно, так же как и векторы с широким диапазоном хозяев, такие как векторы, полезные для грамположительных бактерий и грамотрицательных бактерий. Могут использоваться плазмиды со слабой репликацией, со средней репликацией, также как и с высокой репликацией.

Например, в *B. subtilis* плазида со слабой репликацией - это *pAMBeta1*, плазмиды со средней репликацией - это производные *pBS72*, а плазмидой с высокой репликацией является *pUB110*. Полезные векторы, например, для *E. coli*, это *pBR322*, *pUC18*, *pACYC177*, *pACYC184*, *pRSF1010* и *pBAW22* или их производные, такие как плазида *pBLL15* или плазида *pAKL15E*.

Генетически модифицированная бактериальная клетка-хозяин согласно настоящему изобретению не способна деактивировать белок-регулятор транскрипции, управляющий промотором при отсутствии индуцирующего источника углерода указанного промотора. Так как этот промотор вектора управляется тем же самым белком-регулятором транскрипции, что и соответствующий хромосомный промотор, продолжается экспрессия гетерологической последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей целевой полипептид, даже в отсутствие индуцирующего источника углерода.

Наряду с этим, предметом настоящего изобретения является способ получения гетерологического полипептида в генетически модифицированной бактериальной клетке-хозяине согласно настоящему изобретению, включающий в себя этапы:

а) культивирование в условиях, позволяющих экспрессию этого полипептида, генетически модифицированной бактериальной клетки-хозяина согласно настоящему изобретению, трансформированной вектором, содержащим последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую полипептид, оперативным путём связываемый с промотором, при этом промотор этого вектора регулируется белком-регулятором транскрипции, который не может быть деактивирован при отсутствии источника углерода, специфичного для данного белка-регулятора транскрипции, и

б) извлечения этого полипептида из клеток или из клеточной культуры. Согласно настоящему изобретению, экспрессия целевого полипептида запускается автоматически в момент времени, когда в культуральной среде заканчивается: первичный источник углерода или же концентрация первичного источника углерода падает ниже уровня, требуемого для ССР.

Чтобы дать возможность клеткам расти после индукции, первичный источник углерода может подаваться в культуральную среду в дальнейшем, на уровне, который не позволяет углеродную катаболитную репрессию. Например, первичный источник углерода вводится в количестве, которое немедленно потребляется клетками, в результате чего в культуральной жидкости практически отсутствует первичный источник углерода, который мог бы стимулировать ССР.

В общем, можно сказать, что если объём первичного источника углерода, присутствующий в среде, превышает 1,0 г/л, то наблюдается углеродная катаболитная репрессия, тогда как если объём составляет 0,01 г/л или меньше, то углеродную катаболитную репрессию не наблюдают.

Так как граница углеродной катаболитной репрессии и индукции промотора коррелирует со скоростью роста клеток, которая в свою очередь находится в определённой связи с объёмом первичного источника углерода, вводимого в эту среду или присутствующего в этой среде, то объём первичного источника углерода, который не вызывает углеродную катаболитную репрессию, можно регулировать путём контроля за скоростью роста. Если при заданной скорости роста происходит углеродная катаболитная репрессия, то объём первичного источника углерода, добавляемый к среде, должен быть уменьшен, в результате чего уменьшится скорость роста до величины, при которой не будет отмечаться углеродная катаболитная репрессия.

Для большинства ферментационных процессов на стадии индукции целесообразна корректировка добавления первичного источника углерода до определённого объёма, что приводит к удельной скорости роста $\mu \leq 0,2 \text{ ч}^{-1}$.

В любом случае, для конкретного ферментационного процесса опытным путём легко определяется подходящее значение для удельной скорости роста μ .

Применяемые векторы так же, как и построение и трансформация хозяина соответствуют вышеописанным.

В качестве системы культивирования клеток непрерывное или периодическое культивирование, такое как периодический метод или периодический с подпиткой, может быть реализовано в пробирках, встряхиваемых колбах или в ферментёрах для культивирования микроорганизмов, и т.д. Предпочтительно, на стадии индукции, когда экспрессируется целевой полипептид, первичный источник углерода вводится по экспоненте в культуральную среду.

Для культивирования генетически модифицированных бактериальных клеток-хозяев могут использоваться обычные среды, как это известно в данной области техники, такие как комплексные среды, так называемая "среда на питательном бульоне с дрожжами", представляющая собой содержащую глицерин среду, как это описано авторами Kortz et al., J. Biotechnol. (1955) 39: 59-65, среду с минеральными солями, описанную авторами Kulla et al., Arch. Microbiol. (1983) 135: 1, среду LB, описанную авторами Bertani et al., J. Bacteriol. 1951) 62: 293-300, или среду для периодического культивирования для ферментации *E.coli*, как описано авторами Wilms et al., Biotechnol. Bioeng. (2001) 73: 95-103.

Эта среда содержит подходящий источник углерода, например сахар, такой как глюкоза, для выращивания клетки-хозяина до необходимой клеточной плотности. В качестве источника углерода для соответствующей клетки-хозяина используется первичный источник углерода, который отличается от индуктора, каким является вторичный источник углерода для указанной клетки-хозяина.

Эта среда может быть модифицирована необходимым образом, например, добавлением дополнительных ингредиентов, таких как буферные растворы, соли, витамины, аминокислоты, антибиотики или другие микроэлементы, каковые общеизвестны для специалистов в данной области техники. Также могут использоваться различные среды или комбинации сред во время культивирования этих клеток.

Согласно одному варианту осуществления изобретения, к культуральной среде добавляют казаминовые кислоты. Было выявлено, что присутствие казаминовых кислот в этой среде может помочь в подавлении экспрессии по уровню основности.

Обычно казаминокислоты могут добавляться в объёме от 0,05 до 0,1% (вес/объём).

В соответствии с одним вариантом данного способа получения гетерологического полипептида, может использоваться бактериальная клетка-хозяин, содержащая гены, кодирующие оперон маннозы в её геноме, то есть для которой манноза является вторичным источником углерода и для которой, например, глюкоза является первичным источником углерода. Для того чтобы подходить для данного способа, эта бактериальная клетка лишается способности деактивировать белок-регулятор транскрипции, контролирующей промоторы оперона маннозы.

Например, нуклеотидную последовательность *manP*, кодирующая *ManP*, можно удалить, ингибируя таким образом деактивацию *ManR* фосфорилированием через *ManP*.

В бактериальную клетку-хозяин с удалённым *manP* вводят вектор, содержащий промотор *P_{manR}* или промотор *P_{manP}*, оперативным путём связанный с последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей целевой полипептид.

Рекомбинантную бактериальную клетку-хозяин выращивают в культуральной среде, подходящей для указанной бактериальной клетки-хозяина, при этом эта культуральная среда может содержать глюкозу, и/или глюкоза может вводиться в эту культуральную среду в объёме, достаточном для размножения этой бактериальной клетки-хозяина и для подавления экспрессии целевого полипептида вследствие углеродной катаболитной репрессии - через посредство глюкозы - промотора маннозы, содержащегося в векторе.

Как только уровень глюкозы в среде упадёт ниже значения, требуемого для углеродной катаболитной репрессии, углеродная катаболитная репрессия промотора маннозы этого вектора пропадает, и промотор маннозы начинает экспрессию этого полипептида без необходимости индукции маннозой. Кроме того, так как в бактериальном геноме последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая *ManP*, удалена, то промотор маннозы не может деактивироваться в результате фосфорилирования через *ManP*. Таким образом, способ согласно данному изобретению позволяет осуществить экспрессию целевого полипептида под контролем промотора, индуцируемого специфическим источником углерода, без наличия индуцирующего источника углерода.

Обычно во время фазы индукции в ходе ферментационного процесса с использованием бактериальной клетки-хозяина, трансформированной вектором, содержащим промотор оперона маннозы, в ферментационную среду может вводиться глюкоза, являющаяся первичным источником углерода этих промоторов оперона маннозы, в количестве, обеспечивающем удельную скорость роста $\mu \leq 0,2 \text{ ч}^{-1}$. Кроме того, предпочтительно вводить экспоненциальное количество.

В принципе, пояснения, приведённые выше в отношении первого альтернативного варианта настоящего изобретения, совсем не требующего индуцирующего источника углерода для индуцирования промотора, также применимы и ко второму альтернативному варианту настоящего изобретения, в соответствии с которым снижено количество источника углерода, требуемое для индукции.

Настоящее изобретение целесообразно в том, что промоторы, контролирующие экспрессию гетерологической последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей целевой полипептид, обеспечивают точную регуляцию.

Добавление или присутствие индуцирующего источника углерода не требуется.

Согласно первому альтернативному варианту настоящего изобретения промотор находится в активном состоянии без индуцирующего источника углерода, то есть в отсутствие индуктора.

Промотор маннозы PmanP оперона маннозы *B.subtilis*, как было доказано, является: сильным промотором. Подробное описание этого оперона маннозы приведено в работе авторов Sun T. Et al., "Определение характеристик системы использования маннозы в *Bacillus subtilis*" J. Bacteriol. 192, 2010, 2128-2139, которая включена в настоящее описание в виде ссылки.

Надёжный контроль свойств экспрессии генов с помощью PmanP делает этот промотор пригодным для гетерологического получения ценных полипептидов. Однако с помощью настоящего изобретения было выявлено, что система экспрессии *B.subtilis*, в которой задействован оперон маннозы, требует большого объёма маннозы для получения постоянно высоких скоростей экспрессии. Мы считаем, что причина быстрого потребления маннозы в качестве индуктора состоит в том, что манноза - это один из предпочтительных источников углерода для *B.subtilis*. Однако манноза является довольно дорогостоящим сахаром, что делает такую систему экспрессии экономически нереализуемой для промышленных установок большого объёма.

В целях оптимизации такой системы экспрессии для промышленного применения, этот индуктор не должен метаболизироваться.

Согласно настоящему изобретению, это достигается путём модификации или предпочтительно разрыва гена manA маннозо-6-фосфат изомеразы в хромосомном геноме клетки-хозяина для лишения этой клетки-хозяина способности преобразовывать исходный маннозо-6-фосфат во фруктозо-6-фосфат, что впоследствии вызывает гликолиз.

Такая система экспрессии требует намного меньший объём индуктора и, тем не менее, могут быть достигнуты высокие скорости экспрессии.

Как описано выше, конкретная целесообразная система экспрессии будет такой, что она является самоиндуцируемой, это такая система, которая не требует больше никакого индуктора. Согласно предпочтительному варианту настоящего изобретения, такую самоиндуцируемую систему экспрессии получают путём лишения способности к деактивации гена manP в опероне маннозы генома бактериальной клетки-хозяина в отношении белка-регулятора ManR в результате предотвращения фосфорилирования областей ЕПВ и аналогичных ЕПА у ManR через ManP.

Предпочтительно хромосомный ген manP удаляется ("нокаутированный" мутант).

В такой системе экспрессии промотор PmanP находится только под регуляторным контролем от ССР, осуществляемым с помощью глюкозы. До тех пор, пока глюкоза не начнёт ограничивать, регулятор ManR сможет связываться со своей системой оператора и начнёт эту экспрессию. Такая самоиндуцируемая система экспрессии очень ценна для промышленных случаев применения, так как в виртуальном смысле не происходит преждевременной экспрессии гена.

Например, при периодическом ферментационном культивировании с подпиткой в виртуальном плане не наблюдается нежелательной экспрессии на фазе периодического культивирования, и не требуется добавления никакого индуктора для достижения высоких уровней экспрессии в течение всей фазы периодического культивирования с подпиткой. Такая система экспрессии особо подходит для ферментации высоких объёмов клеток и позволяет достичь высоких уровней экспрессии.

Новая система экспрессии, созданная настоящим изобретением, в частности, новая система автоиндукции, действительно вносит значительный вклад в улучшение выхода продукта и в снижение затрат, связанных с её техническим применением.

Как показано в нижеследующих примерах, настоящее изобретение обеспечивает получение гетерологических полипептидов путём культивирования генетически модифицированной бактериальной клетки-хозяина согласно настоящему изобретению, при котором во время выращивания генетически модифицированных бактериальных клеток-хозяев и до индукции, происходит очень слабая - или совсем не происходит - преждевременная экспрессия полипептида, то есть фактически нет утечки промотора, контролирующего экспрессию генов, кодирующих этот полипептид. Кроме того, получение полипептида начинается сразу же после автоиндукции с высокими уровнями производительности с высокой конечной производительностью.

Также приведён пример дальнейшего альтернативного варианта настоящего изобретения, в котором в геноме бактериальной клетки-хозяина, несущей вектор с индуцируемым маннозой промотором и гетероциклической нуклеиновых кислот, осуществляют делецию гена, кодирующего маннозо-6-фосфат изомеразу.

Вышеприведённое описание будет понятным более полно при ознакомлении с нижеследующими примерами. Такие примеры, однако, являются показательными в отношении способов практического осуществления настоящего изобретения, и они не ограничивают объём данного изобретения.

1) Выделение и идентификация промоторных областей промотора manR и промотора manP оперона маннозы

Если не указано иное, то были использованы следующие материалы и методы:

Бактериальные штаммы и условия роста

В качестве главных хозяев для клонирования и экспрессии использовали *E.coli* JM109 (Yanisch-

Perron C. et al., Gene 33, 1985, 103-119) и *Bacillus subtilis* 3NA, не образующий спор штамм *B.subtilis* с мутацией в гене *spoOA* (Michel J.F. et al., J. Appl. Bacteriol. 33, 1970, 220-227). Дополнительными штаммами, используемыми для экспериментов с ферментацией, были *B.subtilis* 3NA, штаммы-мутанты TQ281 (*spoOA ΔmanA:: ermC*) (Sun T. et al., J. Bacteriol. 192,2010, 2128-2139) и TQ356 (*spoOA ΔmanA:: ermC*) (см. ниже II, эксперимент 4, б).

Штаммы выращивали при 37°C в среде LB (Bertoni G., J. Bacteriol. 62, 1951, 293-300).

Условия селекции были следующими: 100 мкг·мл⁻¹ ампициллина, 100 мкг·мл⁻¹ спектиномицина, 5 мкг·мл⁻¹ эритромицина.

Для индукции промотора маннозы добавляли стерильную фильтрованную или автоклавированную D-маннозу до конечной концентрации 0,2 % вес/объём.

Материалы

Все химикаты были получены от компаний Сигма-Олдридж (Тауфкихен, Германия), Флука (Бухс, Германия) или Мерк (Дармштадт, Германия). Олигонуклеотиды с синтетической ДНК были приобретены у компании Eurofins MWG Operon (Эберсберг, Германия). Ферменты рестрикции и ДНК-модифицирующие ферменты были приобретены у компании Roche Applied Science (Маннгейм, Германия) или New England Biolabs (Франкфурт-на-Майне, Германия). Полимеразно-цепевые реакции (PCR) проводили с использованием полимеразы с высокодостоверной ДНК от компании Fermentas (ST. Leon-Rot, Германия) на ферментёре MiniCycler TM от компании MJ Research Inc. (Уолтан, Массачусетс, США).

Приготовление ДНК и трансформация

Выделение ДНК из *E.coli* и *B.subtilis* или из геля агарозы проводили с помощью комплектов приготовления ДНК компании Qiagen (Hilden, Германия) или Roche (Маннгейм, Германия), как описано изготовителем. В ходе выполнения всех примеров использовали стандартные молекулярные методики.

E.coli трансформировали с помощью ДНК плазмиды согласно описанному авторами Chung ST. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1989, 2172-2175. *B.subtilis* трансформировали с помощью ДНК плазмиды в соответствии с модифицированным "Парижским методом" (Hardwood C.R. Молекулярно-биологические методы для *Bacillus*, 1990, John Wiley & Sons Ltd., Англия).

Измерение β-галактозидазной активности

0,1 мл исследуемых клеток обрабатывали в 900 мкл буферного раствора Z и 10 мкл толуола в течение 30 мин при 37°C. β-галактозидазную активность определяли с помощью о-нитрофенил-β-галактопиранозиды при 22°C согласно методике Миллера (Miller J.H., 1972, Эксперименты в молекулярной генетике, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк).

Используемые олигонуклеотиды (праймеры)

Таблица 1

Олиго-нуклеотид	Последовательность	Цель
s4693	5'-AAA AAA ACG CGT GTT TAA ACT GAA TTT CTG CTG AAT ATA CA-3'	Аmplификация PCR фермента <i>ManR</i> от <i>B subtilis</i>
s4694	5'-AAA AAA TCT AGA AAG TGT GAA TAA TAA GAT CTT G-3'	Аmplификация PCR фермента <i>ManR</i> от <i>B subtilis</i>
s4802	5'-AAA AAA ACT AGT GTT TAA ACA GGG AAA AAT GCC TTT ATT AC-3'	Прямой праймер для амплификации <i>PmanP</i>
s4833	5'-AAA AAA GTT TAA ACC CCT GGC GAA TGG CGA T-3'	Аmplификация <i>src</i> из плазмиды pDG1730
s4835	5'-AAA AAA GAA TTC ATT AGA ATG AAT ATT TCC CAA AT-3'	Аmplификация <i>src</i> из плазмиды pDG1730

s4956	5'-AAT TGC GTC GAG ACC CCT GTG GGT CTC GTC GTT TTT TGG ATC CGG CGC CCA CGT GGC TAG CC-3'	Инсерция терминатора <i>tufA</i>
s4957	5'-TTA AGG CTA GCC ACG TGG GCG CCG GAT CCA AAA AAC GAG ACC CAC AGG GGT CTC GAC GC-3'	Инсерция терминатора <i>tufA</i>
s5006	5'-Cy5-TAG CCT TTT TTA TAG TTG TTC AGC CAC TGT-3'	Меченый праймер для расширения праймера
s5007	5'-Cy5-ATC CAC GCC ATA ATG CAT GCC GCC ATT AAT-3'	Меченый праймер для расширения праймера
s5019	5'-tta agC TCT TAA GGAG GAT TTT AGA ATG GTC AAA GAA AAA TTCg-3'	T1-область у <i>tufA</i>
s5020	5'-tta agG AAT TTT TCT TTA GCC ATT CTA AAA TCC TCC TTA AGA Gg-3'	T1-область у <i>tufA</i> (дополн.)
s5069	5'-AAA AAA GAA TTC GAT ATC AGA TCT ACG CGT TAA CCC GGG C-3'	PCR гена устойчивости к эритромицину
s5070	5'-AAA AAA CAA TTG AAT CGA TTC ACA AAA AAT AGG-3'	PCR гена устойчивости к эритромицину
s5071	5'-AAA AAA AGA TCT CAT GGC AGG GCT TGA GAA-3'	Делеция <i>manA</i>
s5072	5'-AAA AAA GAA TTC TTA TTT ACC TCT GTG CTT CTT-3'	Делеция <i>manA</i>
s5097	5'-Cy5-CACTGTACCCTATCTGCGAAA-3'	Меченый праймер для расширения праймера
s5098	5'-Cy5-ATTGAGATAATCCTCGATCACTT-3'	Меченый праймер для расширения праймера
s5139	5'-aaa aaa tga tca TTA CTT GTA CAG CTC GTC-3'	F-праймер <i>P_{manP}-eGFP</i>
s5156	5'-aaa aaa tga tca ccg gtC GAT TGC CAC ATT AAA GG-3'	r-праймер <i>P_{manP}-eGFP</i>
s5203	5'-GATATCCTGCACCATCGTC-3'	Обратный праймер для амплификации <i>P_{manP}</i> для изучения промотора

s5208	5'-GGTACCATTCTTGCTGAATA-3'	Аmplификация области PmanR' от pSUN279.2
s5209	5'-CTTAAGCCTGTCTAGTATCTACTTGAG-3'	Аmplификация области PmanR' от pSUN279.2
s5234	5'-aaa aaa ccg CTC GTC TTC CTA AGC ATC CT-3'	Реп. f-праймера (pUB110)
s5235	5'-aaa aaa gaa -tTC GAG ATC AGG GAA TGA GTT T-3'	Реп. r-праймера (pUB110)
s5236	5'-aaa agA ATT AAA GGA GGA ATT CAA AAT GGC AGA	Т1-область у <i>gsiB</i>
	CAA TAA CAA Ag-3'	
s5237	5'-gat ccT TTG TTA TTG TCT GCC ATT TTG AAT TCC TCC TTT AAT Tc-3'	Т1-область у <i>gsiB</i> (дополн)
s5262	5'-AAA'AAA GCT AGC GTT TAA ACA AAA AGC GATT TTA ATG AGC TG-3'	Прямой праймер для амплификации <i>PmaaP</i>
s5362	5'-GGT ACC CCC GGG TAG CCT GGA TGG ATC AGA A-3'	Делеция <i>manP</i>
s5363	5'-ACT AGT GAA TTC CTT TTC CAA TCG CA-3'	Делеция <i>manP</i>
s5407	5'-AAA AAA GGC GCC GCT AGC TGG AGA ATA TAA CGG TT-3'	Делеция <i>manP</i>
s5408	5'-ACA CTC CTT AAG TCT AGA AA-3'	Делеция <i>manP</i>
s5617	5'-GGA GGG GAG AAA ACA CCT A-3'	Делеция <i>manP</i>
s5618	5'-AAA AAA GAT ATC TCA AGA AAA TCC CCC GCT TT-3'	Делеция <i>manP</i>
s5932	5'-AAA AAA GCT AGC GTT TAA ACA GTA TAA AAA TCG CTT TTT TCC-3'	Прямой праймер для амплификации <i>PmarR</i>
s5933	5'-AAA AAA GCT AGC GTT TAA ACC GGA AGC TTC GGT AAA AA-3'	Прямой праймер для амплификации <i>PmarR</i>
s5934	5'-GTG CAG GAG CTC GTT ATC-3'	Обратный праймер для амплификации <i>PmarR</i>

Эксперимент 1:

Выделение фрагмента ДНК, несущего промоторные области оперона маннозы, и определение сайтов инициации транскрипции промотора *manR* и промотора *manP*.

Хромосомную ДНК *Bacillus subtilis* 168 выделяли с использованием Комплекта для крови и тканей DNeasy компании Qiagen (Хильден, Германия).

Фрагмент ДНК размером примерно 2,3 kb с полным геном *manR* и с промотором *manR* и с межгенной областью между *manR* и *manP* с промотором *manP* амплифицировали из полученной ДНК с помощью PCR с использованием праймера s4693/s4694.

Полученный фрагмент ДНК размером примерно 2,3 kb использовали для эксперимента по удлинению праймера с целью определения сайтов инициации транскрипции промотора *manR* и промотора *manP*.

Для выделения мРНК для первого удлинения был сконструирован шаттл-фактор из вектора *E. coli* pIC20HE (Altenbuchner et al., 1992, Methods Enzymol. 216, 457-466) и вектора *B. subtilis* pUB110 (MacKenzie et al., 1986, Plasmid 15, 93-103). Этот вектор содержал ген *lys* в качестве информационного гена, который кодирует зрелую форму лизостафина из *Staphylococcus simulans* (Recsai et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1127-1131).

В эту производную pUB110 с высоким качеством копии клонировали в обратном направлении относительно гена лизостафина фрагмент ДНК на 2,3 kb. Полученную плазмиду назвали pSUN178.4, и вводили её в *Bacillus subtilis* 3NA.

Bacillus subtilis 3NA с плазмидой pSUN 178.4 выращивали в среде LB с канамицином. На экспериментальной фазе роста эту культуру индуцировали с помощью 0,2% вес/объем маннозы. Через 1 ч роста

при 37°C собирали урожай индуцированных и неиндуцированных клеток. Общую РНК выделяли с помощью миникомплекта Qiagen-RNeasy.

Использовали праймеры s5006, s5007, s5097 и s5098, меченые с Cy5 на окончании 5'. Праймер s5006 и s5007 подвергали гибридизации соответственно из +21 до +50 и от +76 до +105 относительно стартового кодона гена лизостафина. Праймер s5097 и s5098 подвергали гибридизации соответственно от +81 до +101 и от +131 до +153 относительно стартового кодона у *manR*.

Для реакции секвенирования плазмиды ДНК от pSUN 178.4, которая служила в качестве стандарта размера, использовали те же самые праймеры. Для обратной транскрипции и секвенирования ДНК использовали AMV-обратную транскриптазу и T7-ДНК полимеразу от компании ROCHE. Продукты обратной транскрипции и секвенирования анализировали на денатурирующем полиакриламидном геле для секвенирования (Поставщик GE healthcare). Все другие использованные реагенты поставлялись от компании Амершам Фармация Биотех в комплекте для секвенирования Autoread.

Сайт инициации транскрипции у промотора *manP* определяли с использованием праймера s5006. Реакции последовательности ДНК плазмиды pSUN 178.4 с тем же самым праймером готовили и проводили на том же самом денатурирующем геле для сравнения. На фиг. 5 показана последовательность ДНК вокруг промотора *manP* с выделенным сайтом инициации транскрипции в точке А (аденин-нуклеотид). При этом отслеживаемые блоки -10 и -35 приводятся курсивом, окончание гена *manR* отмечено стрелками, а сайты рестрикции для *Bgl*II, *Nru*I, *Xba*I, *Nde*I *Afl*III подчеркнуты. IRI-P указывает на несовершенную инвертированную повторяющуюся последовательность, то есть предположительный сайт связывания *ManR*.

Сайт инициации транскрипции промотора *manR* определяли при выполнении выделения РНК и секвенирования ДНК согласно вышеописанному в отношении промотора *manP*, за исключением того, что использовался праймер s5098, который связывается в гене *manR*.

На фиг. 4 последовательность ДНК промоторной области *manR* показана с выделенным сайтом инициации транскрипции в G (гуанин-нуклеотид), отслеживаемые блоки -10 и -35 приводятся курсивом, а начало гена *manR* соответственно отмечается стрелкой. Сайты рестрикции и предположительная последовательность *se* подчеркнуты. IRI-P указывает на несовершенную инвертированную повторяющуюся последовательность, то есть предположительный сайт связывания *ManR*.

Транскрипция из промотора *manR* и, в частности, из промотора *manP* была существенно увеличена при индуцировании этих клеток маннозой, как это было отмечено более сильными сигналами в эксперименте по удлинению праймера.

Использованные праймеры показаны в нижеприведенной табл. 1.

Эксперимент 2.

Эксперимент по удлинению праймера согласно эксперименту 1 определил местоположение сайта инициации транскрипции промотора *manR* вблизи окончания 3' межгенной области между *manR* и началом *manP*. Для более точного определения промоторной области *manP*, фрагмент ДНК 2.3 kb укорачивали пошагово с помощью амплификации по процедуре PCR, при этом на полученных фрагментах последовательностей различной длины проводили обратное клонирование до того же самого базового вектора экспрессии, и исследовали экспрессию.

а) Построение базового вектора экспрессии

Конструировали вектор экспрессии с промотором *IacZ* в качестве информационного гена. Этот вектор экспрессии был создан в качестве шаттл-вектора, способного реплицироваться как в *B.subtilis*, так и в *E.coli*, и был назван pSUN272.1.

Информационный ген *IacZ* вырезали с помощью *Nde*I и *Xma*I из pLA2 (авторы Haldirnann A. et al., 2001, J. Bacteriol. 183, 6384-6393) и соединяли в pJOE5531.1, являющимся дериватом индуцируемого рамнозой вектора экспрессии pWA21 (авторы Wegerer et al., 2008, BMC. Biotechnol. 8, 2), который содержал терминатор транскрипции *tufA* из *B.subtilis* на сайте *Xma*I. В эту плазмиду вводили пару олигонуклеотидов s4956/4957 между сайтами рестрикции *Afl*III/*Mun*I с целью добавления того же самого терминатора транскрипции *tufA* в обратном направлении от *IacZ*. Поэтому "сплошное считывание" от плазмидных промоторов в *IacZ*, так же, как и "сплошное считывание" из *IacZ* в расположенные по бокам плазмидные последовательности предотвращалось этими терминаторами. Ген *src* устойчивости к сиектиномицину как для *E.coli*, так и для *B.subtilis*, амплифицировали из плазмиды pDG1730 (авторы Geurout-Fleury et al., 1996, Gene 180, 57-61) с олигонуклеотидами s4833/4835 и вводили в полученную выше плазмиду. В дополнение к этому, часть вектора *E.coli* была укорочена путем удаления фрагмента *Bsp*HI/*Hind*III. Таким образом, фрагмент *Eco*RI/*Sph*I с областью репликации от *B.subtilis* pMTLBS72 (авторы Lagodich et al., 2005, Mol. Biol. (Mosk) 39, 345-348) был лигирован в эту плазмиду.

Фрагмент ДНК на 2.3 kb, полученный в ходе Эксперимента 1 был введен в pSUN272.1 напротив *IacZ* путем разложения с помощью *Afl*III и *Nhe*I и лигирования, в результате чего получали вектор экспрессии pSUN279.2 с плазмидной картой, что отображено на фиг. 7. Используемые праймеры показаны в вышеприведенной табл. 1.

б) Определение эффективности экспрессии вектора pSUN279.2

Плазмиды pSUN279.2 и pSUN272.1, полученные в вышеприведенном разделе а), вводили в

B. subtilis 3NA. Последний служил в качестве контроля фона. Штаммы *B. subtilis* 3NA, несущие ту или другую плазмиду, выращивали в среде LB со спектиномицином, и в ходе экспоненциальной фазы роста к культурам для индуцирования добавляли либо 0,2% маннозы, 0,2% маннозы плюс 0,2% глюкозы, или же не добавляли никакого сахара (неиндуцированное управление). После часа индуцирования определяли β -галактозидазную активность клеток с помощью метода Миллера. Результаты приведены на фиг. 8.

Неиндуцированная культура *B. subtilis*, содержащая pSUN279.2, уже демонстрировала довольно высокий базовый уровень β -галактозидазной активности. Присутствие маннозы приводило к дальнейшему 4-х-кратному росту β -галактозидазной активности, тогда как активность с маннозой и глюкозой была снижена, но была всё ещё значительно выше указанного базового уровня. Эти результаты ясно показывают, что активность промотора, отмеченная в pSUN279.2, могла бы происходить из области между manR и manP, из области в обратном направлении к manR или из обеих областей.

Таким образом, область в обратном направлении к manR, так же, как и наибольшая часть manR, были обе удалены из pSUN279.2 путем отсекаания фрагмента ДНК на 2.3 kb от pSUN279.2, как показано на фиг. 7 между SfoI и NruI, в результате чего получена плазида pSUN284.1.

B. subtilis 3NA трансформировали с помощью этой плазмиды pSUN284.1 и эффективность экспрессии определяли согласно вышеописанному. Результат показан на фиг. 8. Как следует из фиг. 8, этот удаленный вектор pSUN284.1 из manR в *B. subtilis* 3NA демонстрировал только примерно половину базового уровня β -галактозидазной активности по сравнению с pSUN279.2 в *B. subtilis* 3NA, что представляет в равной степени более значительное увеличение с помощью индукции маннозой и вновь более значительное уменьшение в присутствии глюкозы. Эти результаты доказывают, что промотор manP располагается между manR и manP, и показывают, что хромосомная копия manR достаточна для регулирования копий промотора manP на плазмидах с низкой степенью копирования.

в) Определение местоположения промоторной области manR

Для определения местоположения промоторной области manP, в дополнение к укороченному фрагменту ДНК от pSUN284.1, из ДНК-фрагмента 2.3 kb приготавливали дополнительные фрагменты с укороченной последовательностью путём амплификации фрагментов ДНК с помощью процесса PCR, которые укорачивали в различных положениях в обратном направлении относительно сайта инициации транскрипции промотора manP и вводили фрагменты в pSUN272.1, как показано на фиг. 5.

Выполнение делеции вплоть до bp -81 и bp -80 в обратном направлении по отношению к сайту инициации транскрипции от manP приводило к получению второй последовательности делеции, включающей в себя последовательность № 1.

Дальнейшую делецию выполняли в прямом направлении до -41 и до -40 bp по отношению к сайту инициации транскрипции manP (третья последовательность делеции).

Плазмиды, содержащие вторую последовательность делеции, pSUN290, и третью последовательность делеции pSUN297.5, конструировали сходным образом с плазмидой pSUN284.1 согласно изложенному выше в разделе 2б, путём инсерции продуктов операции PCR, амплифицируемых с праймерами s4802/s5203 и s5262/s5203, соответственно, в pSUN272.1 через ферменты рестрикции EcoRV и NheI.

Эти плазмиды вводили в *B. subtilis* 3NA и культивировали согласно изложенному в эксперименте 2б. Спустя 1 ч после индукции определяли β -галактозидазную активность клеток согласно изложенному выше в эксперименте б). Результаты показаны на фиг. 9.

Как показано на фиг. 9, ни один из штаммов с pSUN290 и pSUN284.1 не проявлял отличий в отношении индукции IacZ маннозой. Однако в *B. subtilis* 3NA, содержащей psUN297.5, индукция маннозой была полностью аннулирована и базовый уровень экспрессии был близок к 0. Эти результаты показывают, что сайт связывания ManR у промоторной области маннозы manP располагается между bp -80 и -35 относительно сайта инициации транскрипции manP.

Эксперимент 3. Определение промотора manR

а) Идентификация последовательности cge

Так как наибольшая часть углеродной катаболитной репрессии CCR в Firmicutes происходит опосредованно через белок управления катаболитом А (CcpA), то поиск соответствующих сайтов связывания (последовательность cge) проводился во всём опероне маннозы с использованием функции выравнивания ДНК в программе управления клонированием. Для этого выравнивания использовали согласованную последовательность cge 5'-WWTGNAARCGWWCAWW-3'.

Только в промоторной области manR была обнаружена одна предположительная последовательность cge, что показано на фиг. 4, которая располагается в прямом направлении к блоку -10.

б) Оценка эффективности экспрессии промотора manP

Для оценки эффективности экспрессии промотора manR был построен вектор экспрессии, такой как psUN284.1, согласно вышеизложенному, и который был назван psUN291. Для этой цели фрагмент ДНК, включающий предположительный промотор manR и примерно 600 bp в обратном направлении относительно manR, амплифицировали с праймером s5208/s5209 и линейаризованной плазмидной ДНК psUN279.2 в качестве матрицы и вводили напротив IacZ в плазмиду psUN272.1 путём разложения с помощью *KpnI* и *AflII* и лигирования.

ДНК-последовательность показана на фиг. 4.

Плазмиду pSUN291 вводили в *B.subtilis* 3NA и измеряли β -галактозидазную активность согласно изложенному в эксперименте 2б).

Результат отображён на фиг. 10. Здесь базовая экспрессия уже была относительно высокой, и она была ещё увеличена трёхкратно добавлением 0.2% маннозы. Добавление глюкозы привело к подавлению β -галактозидазной активности практически до базового уровня экспрессии.

Этот результат показал, что промотор *manR* не является просто слабым составным промотором, а способен регулироваться маннозой и процессом CCR.

в) Локализация местоположения промоторной области *manR*

Как и в эксперименте 2в) для последующей локализации положения промоторной области у *manR*, были приготовлены фрагменты ДНК различной длины из ДНК-последовательности, содержащейся в pSUN291 с помощью процедуры PCR с амплификацией ДНК праймерами, связанными в различных положениях в обратном направлении по отношению к сайту инициации транскрипции промотора *manR* (праймер s5932 и s5933) и к праймеру, связанному в прямом направлении в гене *IacZ* (s5934) (фиг. 4).

Первую последовательность делеции получали отсечением последовательности, показанной на фиг. 4, вплоть до bp -82 и bp -81 в обратном направлении по отношению к сайту инициации транскрипции G, а вторую делецию получали отрезанием вплоть до bp -62 и bp -61 в обратном направлении по отношению к сайту инициации транскрипции G.

Аналогично эксперименту 2в) полученные после операции PCR фрагменты разлагали с помощью *endoR Sad* и *NheI* и лигировали с pSUN279.2, при этом ДНК разлагали с помощью тех же самых ферментов рестрикции, а полученные плазмиды называли pSUN385.2 и pSUN386.9 соответственно.

Каждую плазмиду вводили в *B.subtilis* 3NA и культивировали согласно изложенному в эксперименте 2б. Спустя час после индукции определяли β -галактозидазную активность клеток согласно изложенному в эксперименте 2б. Результаты показаны на фиг. 10. Нет значительной разницы между индукцией *IacZ* маннозой от *B.subtilis* 3NA, содержащей pSUN385.2, по сравнению с pSUN291. Однако в *B.subtilis* 3NA pSUN386.9 со второй последовательностью делеции индукция маннозой была полностью устранена и базовый уровень экспрессии был почти равен 0. Из этих результатов следует, что сайт связывания *ManR* промоторной области *manR* располагается между bp-81 и bp-35 по отношению к сайту инициации транскрипции от *manR*. Сайт связывания *ManR* мог бы даже перекрывать последовательность -35, как это выявлено в отношении классических активаторов, так как инвертированная повторяющаяся последовательность, найденная в предложенном сайте связывания, продолжается внутрь предложенной последовательности -35.

II) Построение рекомбинантной клетки-хозяина с генетически изменёнными областями оперона маннозы

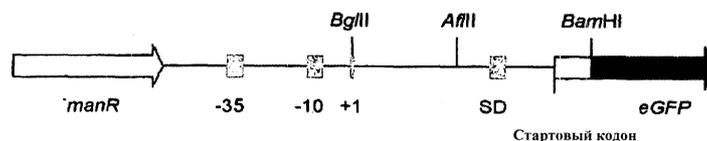
Эксперимент 4: Трансформация

а) Конструирование плазмиды pMW 168.1 как вектора экспрессии

При использовании последовательности нуклеиновых кислот промоторной области *manP*, в том виде, как она введена в плазмиду pSUN284.1, которая показана на фиг. 5 и в том виде, как она используется в эксперименте 2в, плазмиду pMW168.1 конструировали согласно изложенному ниже и вводили в *B.subtilis* 3NA как в хозяина.

Шаттл-вектор, реплицируемый как в *E.coli*, так и в *B.subtilis*, строили согласно изложенному в Эксперименте 2а), за исключением того, что eGFP использовали в качестве информационного гена вместо *IacZ*. Также область инициации транскрипции у *manP* была заменена областью инициации транскрипции гена *gsiB* (стрессовый белок; авторы Jürgen et al., см. выше). Таким образом, стартовый кодон от eGFP и 6 кодонов, следующих за стартовым кодоном, были заменены.

Схематическая структура полученных промоторной области и области инициации транскрипции была следующей:



Показано расположение генов (стрелки) и областей (блоки) с соответствующими сайтами рестрикции.

Последовательность области инициации транскрипции *gsiB* в используемом виде была такой:

5'-cttaagAATTAAGGAGGAATTCAAAATGGCAGACAATAACAAggatcc-3'
 AflI SD Стартовый кодон BamHI

В общем плазмиду pMW168.1 получали так, как показано в технологическом карте в соответствии с фиг. 15.

На схеме технологического процесса используемые здесь названия ДНК векторов, ДНК вставок и комплементарных олигонуклеотидов представлены согласно указанному в блоках; что касается продуктов полимеразно-цепных реакций (PCR), то эти праймеры и матрицы ДНК были такими, какие представ-

лены в скобках, используемые ферменты рестрикции указывались на соответствующих сайтах.

Этапы клонирования выполнялись с использованием *E.coli* JM109.

Используемые плазмиды представляли собой pUC 18 - вектор клонирования для продуктов PCR с устойчивостью к ампициллину (авторы Yanosch-Perron et al., см выше); pWA21 - вектор экспрессии и клонирования для *E.coli* с устойчивостью к ампициллину (Wegerer et al., 2008, BMC Biotechnol. 8,2); pSUN202.4 - дериват pUB 110 с промоторной областью manP и с устойчивостью к ампициллину и к кап, представляющий собой шаттл-вектор для *E.coli* и *B.subtilis*; и pSUN266.1 - дериват pUC18 с сайтом интеграции между трет-последовательностями и с устойчивостью к *src* и к ампициллину.

Плазмида pSUN266.1 является производной индуцируемого рамнозой вектора экспрессии pWA21, где промотор рамнозы и ген eGFP заменяли на последовательность, содержащую два терминатора транскрипции гена *tufA* от *Bacillus subtilis* в прямой ориентации и разделенных сайтами рестрикции для *Bam*HI, *Sma*I и *Af*II (см. нижеприведённую последовательность), так же, как и ген устойчивости к спектиномицину. Последний амплифицировали из плазмиды pDG1730 (Cuerout-Fleury et al., 1996) с праймерами s4833 и s4835 (табл. 1). В конечной конструкции pMW168 промотор маннозы и ген eGFP вставляется между обеими последовательностями терминатора транскрипции *tufA*.

*Bam*HI *Sma*I *Af*II

AATTGCGTTCGAGACCCCTGTGGGTCTCGTTTTTTGGATCCCCGGGACGTCGAGACCCCTGTG
TTAACGCAAGCTCTGGGGACACCCAGAGCAAAAAACCTAGGGGCCCTGCAAGCTCTGGGGACAC

*Pme*I *Hind*III

GGTCTCGTTTTTGTTTAAACAAGCTT
CCAGAGCAAAAAACAATTTGTTCGAA

Нуклеотидная последовательность обеих последовательностей терминаторов *tufA*, (жирный шрифт, курсив) и сайты рестрикции между ними и в конце последовательности (подчёркнуто).

Замещение области инициации транскрипции, включая стартовый кодон и кодоны, следующие за стартовым кодоном, было произведено с использованием комплементарных олигонуклеотидов и через одиночные сайты рестрикции *Bg*/II, *Af*/II и *Bam*HI.

Конструирование вектора начинали с замещения области инициации транскрипции гена T7 10 вектора pWA21 (авторы Wegerer et al., см. выше) областью инициации транскрипции от *tufA* из *B.subtilis* через комплементарные олигонуклеотиды s5019 и s5020, соответственно. При последующих этапах клонирования эту область инициации транскрипции замещали областью от *gsiB* (Олигонуклеотиды s5236/s5237). Конечная плазмида pMW168.1 содержала замещающий (*rep*) ген, включающий в себя *ori*⁺ от pUB110.

Плазмидная карта от pMW168.1 показана на фиг. 11.

б) Штаммы-мутанты деления, в которых отсутствуют *manP* (Δ manP) и *manA* (Δ manA)

б1) Инсерционный вектор для деления *manP*

Был использован инсерционный вектор pSUN356.7 для делеции гена *manP*, кодирующего маннозо-специфичный ЕП из оперона маннозы на хромосоме, не способной к споруляции *B.subtilis* NA, и полученный штамм был назван *B.subtilis* TQ356 (*spo*OA *man*::*ermC*). В качестве маркера селекции использовали кассету устойчивости к эритромицину.

Вектор pSUN356.7 - это дериват pUC18 (устойчивость к ампициллину) и содержит ген устойчивости к эритромицину, охватываемый по бокам последовательностями *manR* и *manA*, а снаружи - сменную кассету с геном устойчивости к спектиномицину. Ген устойчивости к спектиномицину амплифицировали из pDG1730 (см. выше в отношении pSUN266.1). Ген устойчивости к эритромицину амплифицировали из плазмиды pDG1730 праймером s5069 и s5070. С-концевую область гена *manR* амплифицировали из ДНК *Bacillus subtilis* праймером s5407 и s5408 и вставляли на одну сторону гена эритромицина. N-концевую область у *manA* амплифицировали из хромосомы *Bacillus subtilis* праймером s5362 и s5363 и вставляли с другой стороны гена устойчивости к эритромицину. Плазмидная карта pSUN356.7 показана на фиг. 12.

б2) Деления *manA*

Затем получали нокаут-мутант *B.subtilis* с удалённым *manA* из оперона маннозы на хромосоме, не способной к споруляции *B.subtilis* 3NA, с инсерционным вектором pSUN281, в результате получали *B.subtilis* TQ281 (*spo*OA3 *manA*::*ermC*) (см. выше Sun T. et al.).

Ген *manA* кодирует маннозо-6-фосфат изомеразу, которая преобразует маннозо-6-фосфат во фруктозо-6-фосфат.

Для отслеживания успешности делеции использовали кассету устойчивости к эритромицину.

б3) Трансформация

Каждую из *B.subtilis* TQ356 и *B.subtilis* TQ281 трансформировали согласно вышеприведённым б1) и б2) плазмидой pMW168.1, полученной в а1).

Использованные среды:

а) Среда с минимальным содержанием глюкозы (МГ):

2,0 г	(NH ₄)SO ₄
6,0 г	KH ₂ PO ₄
14,0 г	K ₂ HPO ₄
1,0 г	Na ₃ Цитрат
0,2 г	MgSO ₄ *7 H ₂ O
5,0 г	Глюкоза (отдельно в виде 20-50% маточного раствора)

б) Среда I:

9,5 мл	MG
0,20 мл	Казаминоокислоты (1% маточного раствора)
0,05 мл	MgSO ₄ (маточный раствор 1M)

в) Среда II:

8,00 мл	MG
0,10 мл	Казаминоокислоты (1% маточного раствора)
0,05 мл	MgSO ₄ (маточный раствор 1M)

Трансформацию выполняли в соответствии с протоколом Anagnostopulos et al., "Требования к трансформации в *Bacillus subtilis*", J. Bacteriol. (1961) 81: 741-746.

Одиночную колонию каждого бактериального штамма вводили в 5 мл среды I и инкубировали при 37°C во вращающемся сосуде всю ночь. 1 мл культуры утром (оптическая плотность OD₆₀₀ в пределах от 1 до 2) переносили в 8 мл среды II в 100-мл колбе Эрленмейера с отбойниками и инкубировали при 37°C в течение 85 мин. Затем 1 мл соответствующих клеток переносили в пробирки компании Шютт и смешивали с соответствующими инсерционными векторами. До смешивания с соответствующими клетками эти инсерционные векторы укорачивали в сайте без существенной важности одиночным ножом. Полученную смесь осаждали изопропанолом и обеспечивали лигирование при комнатной температуре в течение не менее 2 ч.

Затем полученные трансформированные клетки инкубировали при 37°C в течение 20 мин во вращающемся сосуде, центрифугировали при 4.500 об/мин при комнатной температуре. Дебрис вновь переносили в суспензию в остаточной жидкости и разливали в планшеты.

Эксперимент 5: Ферментация

5.1 Материалы и методы

В общем, и для экспериментов по ферментации использовали стандартные молекулярные технологии, если не указано иное.

Состав сред, использованных для ферментации

Культивирование в течение ночи, и предварительное культивирование № 1 проводили в минимальной солевой среде Шпицицена (SMM) (Spizizen J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 44, 1958, 1072-1078), с добавлением 0,02% (вес/объем) казаминоокислот (BD Difco™, Sparks, Мэриленд, США), так же, как и 100 мкг·мл⁻¹ спектиномицина для селекции плазмид и 5 мкг·мл⁻¹ эритромицина для селекции штаммов (в случае с TQ281 и TQ356). Выращивание предварительной культуры № 2 и ферментационное культивирование (периодическое) проводили с использованием минеральной среды, модифицированной из среды Вилмса и др. (Wilms B. et al., Biotechnol. Bioeng. 73, 2001, 95-103), состоящей из: 1,0 г·л⁻¹ (NH₄)₂ Н-цитрат, 2,0 г·л⁻¹ Na₂SO₄, 2,68 г·л⁻¹ NH₄SO₄, 0,5 г·л⁻¹ NH₄Cl, 14,6 г·л⁻¹ K₂HPO₄, 4,0 г·л⁻¹ Na₂HPO₄·2H₂O, 1,0 г·л⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 3 мл·л⁻¹ раствора микроэлементов (TES), 5 г·л⁻¹ глюкозы для предварительной культуры № 2 и 25 г·л⁻¹ глюкозы для среды периодического культивирования. TES содержит 0,5 г·л⁻¹ CaCl₂, 0,18 г·л⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, 0,1 г·л⁻¹ MnSO₄·H₂O, 10,5 г·л⁻¹ Na₂-ЭДТА, 8,35 г·л⁻¹ FeCl₃, 0,16 г·л⁻¹ CuSO₄·5H₂O и 0,18 г·л⁻¹ CoCl₂·6H₂O. Культуральная среда для процессов ферментации с высокой клеточной плотностью содержала 200 г·л⁻¹ глюкозы, 7,89 г·л⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 40 мл·л⁻¹ TES и 63,36 г·л⁻¹ (NH₄)₂HO₄, когда использовали реактор KLF. Величину pH регулировали до 3,3 с целью обеспечения растворимости всех компонентов. Использовали две отдельных питательных среды при применении 30-литрового реактора. Первая среда содержала 654,76 г·л⁻¹ глюкозы ×H₂O, 23,5 г·л⁻¹ MgSO₄·7 H₂O, 120 мл·л⁻¹ TES, вторая 396 г·л⁻¹ (NH₄)₂HPO₄. Для индукции промотора manP использовали либо 20%-ный раствор D-маннозы, либо отдельный питательный раствор, содержащий 200 г·л⁻¹ маннозы, 7,89 г·л⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 40 мл·л⁻¹ TES и 63,36 г·л⁻¹ (NH₄)₂HPO₄.

Условия культивирования предварительных культур и периодического культивирования с подпиткой

Одиночные колонии из чашек с агаром LB инокулировали в 5 мл минимальной среды Спицицена (SMM) и оставляли расти на всю ночь в течение не менее 14 ч при 37°C. 25 мл среды SMM переносили в 250-миллилитровые качалочные колбы и инокулировали выросшей за ночь культурой до оптической плотности 0,05 (предварительная культура № 1) на (300 нм (Оптическая плотность OD₆₀₀). Через 5 ч инкубирования при 37°C использовали 20 мл предкультуры № 1 для инокуляции 200 мл среды предкультуры № 2 в 1000-миллилитровых качалочных колбах (предкультура № 2). Ещё через 5 ч инкубации при 37°C среду для периодического культивирования инокулировали предкультурой № 2.

Использовали ранее разработанную установку для периодического культивирования с подпиткой, которую оптимизировали для *E.coli* с глюкозой в качестве главного источника углерода (Korz D.J. et al., J. Bacteriol. 39, 1995, 59-65; Wilms, см. выше). Объём для периодического культивирования был 1,5 л при использовании малого лабораторного ферментёра KLF на 3,7 л (Компания Bioengineering AG, Wald, Швейцария) и при объеме питательной среды 1,0 л. При работе на 30-литровом лабораторном ферментёре D598 (Лабораторный ферментёр LF, Компания Bioengineering AG, Wald, Швейцария) объём для периодического культивирования составлял 8,0 л, содержащая глюкозу среда составляла 4,2 л и аммониевая питательная среда была 1,0 л. Среда с глюкозой и аммонием вводили в реактор при соотношении 81%:19%. Питательные среды подавали в биореактор в соответствии с:

$$F(t) = [(\mu_{set} / Y_{X/S}) + m] \times [C_{x0} \times V_0 / C_{s0}] \times \exp(\mu_{set} \times t) \quad \text{Уравнение 1,}$$

где F (л·ч⁻¹) - это скорость расхода,

μ_{set} (ч⁻¹) - это желательная удельная скорость роста,

m (г·г⁻¹·ч⁻¹) - это удельный коэффициент поддержания культуры (= 0,04 г·г⁻¹·ч⁻¹).

$Y_{X/S}$ - это коэффициент удельного выхода биомассы/субстрата (примерно 0,5 для глюкозы),

C_{x0} (г·л⁻¹) - это концентрация биомассы в начале расхода питательных растворов,

V_0 (л) - объём реактора в начале расхода питательных растворов,

C_{S0} (г·л⁻¹) - это концентрация глюкозы в питательном растворе и

t (ч) - это время после начала ввода питательных растворов.

Удельная скорость роста μ в 0,1 ч⁻¹ была выбрана такой во избежание получения неспецифических и нежелательных побочных продуктов и во избежание ограничений по кислороду.

Периодическое культивирование проводили при 37°C до падения температуры до 30°C с началом фазы подпитки во избежание образования нежелательных внутриклеточных телец экспрессируемого герологического белка. Величину pH регулировали до уровня 7,0 с помощью 24%-ного (объём/объём) NH₄OH и 20%-ной (объём/объём) H₃PO₄ соответственно. Значение pO₂ поддерживали на уровне 50%-ного насыщения с помощью автоматически регулируемой скорости мешалки. Скорость аэрации сохраняли постоянной при 2 л·мин⁻¹ при работе на ферментёре KLF и в диапазоне 15-25 л·мин⁻¹ при использовании LF. Превышение давления над атмосферным сохраняли на уровне 0,5 бар. Плотность определяли измерением оптической плотности OD₆₀₀ периодически с помощью спектрофотометра для УФ/Видимой области марки Ultrospec™ 1100 pro (компании GE Healthcare, ранее Amersham Biosciences, Соединённое Королевство). Сухой вес клеток (cdw) определяли умножением значения OD₆₀₀ на коэффициент 0,322 г_{cdw}·л⁻¹, который получали в виде среднего значения после нескольких определений влажности прибором Halogen MB 835 (компания Ohaus Corporation, Pine Brook, Нью-Джерси, США) во время ферментационных процессов. Для управления параметрами ферментации использовали Пакет программного обеспечения Biolog 1.7 (Институт биохимической технологии, Штутгартский университет, Германия [<http://www.Ibvt.uni-stuttgart.de>]). Процессы периодического культивирования с подпиткой завершали примерно через 40 ч проведения процесса.

Измерения флуоресценции в реальном времени и автономно независимо от работы оборудования

Для отслеживания в реальном времени скорости экспрессии вырабатываемых рекомбинантных микроорганизмов eGFP внутри биореактора использовали детектор флуоресценции (Mikropack НРХ-2000, мощный ксеноновый источник света; компания Ocean Optics, Inc.; волоконный оптический спектрометр S2000 компании Dunedin, Флорида, США) был использован внутри биореактора. Длина волны экстинкции составляла 485 нм, тогда как эмиссию детектировали на 535 нм и регистрировали в реальном времени с помощью пакета программного обеспечения Spectra Suite (компании Ocean Optics, Dunedin, Флорида, США). Флуоресцентный свет направляли через оптический фильтр с интенсивностью 0,6. Время интегрирования детектора составляло 50 мс. Из-за того, что это программное обеспечение было способно обчислять только величины до 4.000 импульсов, время интеграции пошагово уменьшали как раз перед достижением более высоких уровней. В результате импульсы флуоресценции после этого умножали на соответствующий коэффициент приведения для получения величин, которые соответствуют 50 мс. Эти замеренные величины были специфичными для определённого объёма реактора.

В дополнение к этому измерения в автономном режиме (независимо от работы оборудования) проводили с использованием микропланшет-ридера SpectraFluor Microplate Reader (Компания Tecan Group Ltd., Мэннедорф, Швейцария). Таким образом, измеряли 3×250 мкл неразбавленной клеточной культуры в 96-ячеечных микропланшетах (компания Greiner-Bio One GmbH, Фрикенхаузен, Германия), используя 3×250 мкл среды периодического культивирования в качестве контрольной пробы (Фильтр возбуждения: 485 нм; Эмиссионный фильтр: 535 нм; Усиление (ручное): 60; время интеграции: 20 мкс; Число вспышек: 3; Режим считывания: Сверху). Среднее значение контрольных величин вычитали из среднего значения образцов для получения конечной величины. Клеточную культуру разбавляли в среде для периодического культивирования по достижении 20.000 единиц счёта.

По результатам калибровки относительно внутреннего очищенного стандартного образца eGFP (чистотой примерно 95%, 1,3 г·л⁻¹), можно было заключить, что примерно 120.000 единиц счёта, изме-

ренных не в режиме реального времени, соответствуют $1 \Gamma_{eGFP} \cdot \text{л}^{-1}$. Удалось доказать, что между величинами, замеренными в режиме реального времени и в автономном режиме, существует линейная связь, которая даёт корреляцию в $1,5 \Gamma_{eGFP} \cdot \text{л}^{-1}$ на каждые 7470 замеренных в режиме реального времени единиц отсчета.

Определение стабильности плазмид

Стабильность вектора pMW168/1 определяли измерения фракции плазмидсодержащих клеток согласно работе Харвуда и Каттинга (Harwood C.R. et al., Молекулярно-биологические методы для Bacillus, 1990, John Wiley & Sons Ltd., Чичестер, Англия).

Анализ белков по методике додецилсульфат натрия - электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE)

Экстракты из сырых клеток получали следующим образом: собирали и центрифугировали 10^{10} клеток. Клеточный осадок после центрифугирования вновь переводили в суспензию с помощью 1 мл 50 мМ буферного раствора фосфата натрия (pH 7,5) и солубилизировали с использованием ультразвука (компания Heat Systems-Ultrasonics, Inc., Ультразвуковой аппарат W-385, Фармингдейл, Нью-Йорк, США; 3×30 с, цикл с 50%-ной нагрузкой). Растворимую белковую фракцию получали из надосадочной жидкости после центрифугирования, а нерастворимую фракцию получали повторным суспендированием осадка после центрифугирования с помощью 1 мл 50 мМ буферного раствора фосфата натрия (pH 7,5). Белковые фракции анализировали по методике SDS-PAGE (Laemmli U.K., Nature 227, 1970, 680-685; LeBlanc D.J. et al., Antimicrob. Agents Chemother 35, 1991, 1804-1810).

5.2 Процессы ферментации с высокой клеточной плотностью с использованием B.subtilis 3NA/pMW168.1.

Система экспрессии маннозы с B.subtilis 3NA/pMW168.1 испытывали в ходе процессов периодического культивирования с подпиткой. Использовали такую установку, которая описана выше (Korz et al., Wilms et al., см. выше).

В ходе первого процесса ферментации, проведённого в ферментёре с мешалкой LF, в культуральную жидкость добавляли добавку в количестве 0,2% (вес/объём) D-маннозы, сразу же с началом фазы культивирования с подпиткой. Сигнал флуоресценции датчика, который до этого не показывал значительной флуоресценции, очень быстро вырос сразу же после индукции. После достижения пикового значения примерно на 2.200 отсчётов после 4 ч на этапе периодического культивирования с подпиткой сигнал начал снова быстро падать. Это его снижение сопровождалось расходом индуктора (замеряемого с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, данные не приведены). В конце процесса было получено $0,2 \Gamma_{eGFP} \cdot \text{л}^{-1}$ или $3 \text{ м}\Gamma_{eGFP}$ на Γ_{cdw} .

В ходе второго процесса ферментации использовали дополнительное введение экспоненциального объёма D-маннозы. Его начинали одновременно с вводом глюкозы при сохранении суммарной концентрации сахаров в обоих добавлениях такой же высокой, что и в первом процессе ферментации. Сигнал флуоресценции запускался сразу же после добавления индуктора и продолжался до конца процесса. Для поддержания этого увеличения в культуральную жидкость реактора добавляли суммарно 50 г D-маннозы. При этом режиме индукции получали $2,1 \Gamma_{eGFP} \cdot \text{л}^{-1}$ или $53 \Gamma_{eGFP}$ на Γ_{cdw} . Подробные результаты этих двух процессов ферментации, проведённых на B.subtilis 3NA/pMW168.1, сведены в таблицу, отображающую результаты в разделе 5.5.

Выработка eGFP росла в течение всей фазы периодического культивирования с подпиткой, но медленнее, чем выработка биомассы. Проверка стабильности плазмид выявила, что примерно 95% клеток всё ещё несли этот вектор по окончании обоих ферментационных процессов.

5.3 Процесс ферментации с высокой клеточной плотностью с использованием штамма ΔmanA TQ281.

Штамм TQ281 делеции ManA, не способный расти на маннозе как единственном источнике углерода (Sun T. Et al., см. выше), был выбран для дальнейших экспериментов по ферментации. B.subtilis 3NA/pMW168.1, трансформированная с помощью pMW168.1, проявляла чувствительность относительно D-маннозы в экспериментах во встряхиваемых колбах.

Было проведено два периодических процесса ферментации с подпиткой с использованием TQ281/pMW168.1. В ходе первого индукция происходила при однократном добавлении маннозы с началом этапа периодического культивирования с подпиткой. В ходе второго одновременно начинали ввод дополнительного экспоненциального количества маннозы. Индукция с D-маннозой не продемонстрировала заметного влияния на удельную скорость роста во время стадии периодического культивирования с подпиткой. При стратегии однократного добавления можно было добиться $0,71 \Gamma_{eGFP} \cdot \text{л}^{-1}$, что соответствует $36 \text{ м}\Gamma_{eGFP}$ на Γ_{cdw} . Подробные результаты этих двух процессов ферментации сведены в таблицу в разделе

5.5 Результаты.

5.4 Разработка и применение системы экспрессии с автоиндукцией при ферментации с высокой клеточной плотностью с использованием штамма ΔmanP TQ356

Штамм B.subtilis ΔmanP TQ356 показал существенную экспрессию в условиях без индукции от

$P_{манP}$, так же, как и эффект CCR в присутствии глюкозы (Sun T. Et al., см. выше). Этот штамм трансформировали с помощью pMW168.1, что приводило к получению колоний с довольно слабой флуоресценцией. После добавления 0,5% (вес/объём) глюкозы к выбранной среде, рост колоний нормализовался. В ходе экспериментов в колбах со встряхиванием были достигнуты высокие уровни экспрессии, когда глюкоза расходовалась полностью (данные не показаны).

В процессе периодического культивирования с подпиткой (фиг. 13) затем использовали *V.subtilis* TQ356, содержащую pMW168.1. На этапе периодического культивирования не смогли обнаружить значительной флуоресценции, сходной с периодическим культивированием штаммов 3NA/pMW186 TQ281/pMW168 на *V.subtilis*. С началом фазы подпитки при периодическом культивировании сигнал флуоресценции от детектора реактора начинал непрерывно возрастать. Спустя 36 ч от начала ферментации уровень экспрессии в этих клетках достигал максимума, как это можно видеть через постоянное значение $Y_{P/X}$ в 14,6% до конца ферментационного процесса, что соответствует постоянной удельной производительности. Было получено примерно $10 \text{ г}_{eGFP} \cdot \text{л}^{-1}$, без добавления какого бы то ни было индуктора, что соответствует 146 мг eGFP на г_{cdw} . Результаты ферментации сведены вместе и сравниваются с другими проведёнными процессами ферментации в нижеприведённой таблице в разделе 5.5 Результаты. Проводили SDS-электрофорез на полиакриламидном геле для получения карты-отпечатка в отношении процентного значения экспрессированного eGFP по сравнению с суммарным белком (фиг. 14). Как можно видеть, по крайней мере 20% от суммарного белка составляют молекулы eGFP. Только малая фракция нерастворима и присутствует в форме внутриклеточных телец (фиг. 14, столбик 7). Неразбавленную надосадочную культуральную жидкость также анализировали с помощью SDS-электрофореза на полиакриламидном геле (фиг. 14, столбик 8) и измеряли на спектрофотометре. В этой надосадочной жидкости было найдено примерно 1% от суммарного замеренного eGFP, что могло бы быть вызвано текущим лизисом клеток в течение всего ферментационного процесса.

Стабильность плазмид и морфологию клеток проверяли в течение всего ферментационного процесса.

5.5 Результаты

Результаты ферментационных процессов из разделов 5.2-5.4 сведены в нижеследующей таблице.

Сравнение проведённых ферментационных процессов в отношении различных режимов индукции и применения штаммов *V.subtilis* с вектором экспрессии pMW168.1.b.

Штамм <i>V.subtilis</i> с pMW168.1	Режим индукции	Реактор с мешалкой	Δt_{fb} [ч]	$C_{x, \text{конечный}}$ [$\text{г}_{cdw} \cdot \text{л}^{-1}$]	$X_{\text{конечный}}$ [$\text{г}_{cdw} \cdot \text{л}^{-1}$]	$C_{P, \text{конечный}}$ [$\text{г}_{eGFP} \cdot \text{л}^{-1}$]	$P_{eGFP, \text{конечный}}$ [г]	$Y_{P/X}$ [%]	r_P [$\text{г}_{eGFP} \cdot \text{г}_{cdw}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$]	q_P [$\text{г}_{eGFP} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$]
3NA (<i>man*</i>)	SA	LF	22,5	73	897	0,2	2,8	0,3	$0,14 \times 10^{-3}$	0,01
3NA (<i>man*</i>)	EF	KLF	23,8	39	103	2,1	5,5	5,3	$2,32 \times 10^{-3}$	0,09
TQ281 ($\Delta manA$)	SA	KLF	11,8	20	39	0,7	1,4	3,6	$2,98 \times 10^{-3}$	0,06
TQ281 ($\Delta manA$)	EF	LF	25,5	59	782	1,9	25	3,2	$1,37 \times 10^{-3}$	0,08
TQ356 ($\Delta manP$)	AI	LF	23,5	67	758	9,8	111	14,6	$6,23 \times 10^{-3}$	0,40

Сокращения и наименования параметров:

SA: Одиночное добавление индуктора (манноза);

EF: экспоненциальный ввод индуктора (манноза);

AI: автоиндукция;

LF: 30-литровый лабораторный ферментёр;

KLF: 3,7-литровый малый лабораторный ферментёр;

Δt_{fb} : время периодического культивирования с подпиткой, конечное;

C_x : конечная концентрация клеток по сухому весу;

X , конечный: абсолютный сухой вес клеток;

C_P , конечный: концентрация продукта;

P_{eGFP} , конечный: абсолютный продукт (eGFP);

$Y_{P/X}$: продукт на грамм клеток по сухому весу;

r_P : удельная производительность;

q_P : объёмная производительность.

Как показывают эти результаты, во время фазы периодического культивирования виртуально не происходила экспрессия информационного eGFP. В ходе самоиндуцируемой ферментации из эксперимента 5.4 инициация самоиндукции в начале ограниченной переходной фазы глюкозы между этапом периодического культивирования и культивирования с подпиткой и её сохранение в течение всей внутренней фазы культивирования с подпиткой при ограничении объёма глюкозы приводили к трёхкратному увеличению выхода продукта до 146 мг GPF на г_{cdw} .

Далее, как показывают результаты, полученные с TQ281 (процесс ферментации 5.3), выход, полученный при единичном добавлении индуктора в 0,7 г (eGFP)/л, может быть значительно увеличен в результате дополнительного ввода индуктора во время экспоненциальной фазы до 1,9 г/л.

5.6 Обсуждение

В процессах ферментации 5.2-5.4 были использованы системы экспрессии *V.subtilis*, содержащие

промотор маннозы PmanP в векторе pMW 168.1 для усиления экспрессии eGFP. Промотор PmanP показал, что он является сильным промотором, который активируется после добавления D-маннозы.

В ходе процесса ферментации 5.2, не спорулирующий штамм 3NA бактерии *B.subtilis*, который был трансформирован этим вектором, обеспечил получение высоких уровней продукта, т.е. $2,1 \text{ г}_{\text{eGFP}} \cdot \text{л}^{-1}$. По сравнению с недавно описанной системой с *B.megaterium* (Stammen et al., Appl. Environ. Microbiol. 76, 2010, 4037-4046), представляющей собой многообещающую систему хозяина для получения рекомбинантного белка, система *B.subtilis* ведёт к получению более высоких результатов. Система получения белка с внутриклеточной *B.megaterium*, которая индуцируется ксилозой, давала $1,25 \text{ г}_{\text{eGFP}} \cdot \text{л}^{-1}$, что соответствует $36,8 \text{ мг}$ на г_{cdw} при периодических процессах ферментации с подпиткой. В дополнение к этому, Stammen et al. (см. выше) использовали антибиотики до конца ферментационного процесса, с тем результатом, что во время этого ферментационного процесса не было потерь плазмид.

Ферментационный процесс 5.2 показывает, что система маннозы довольно эффективна в отношении уровней производительности, однако однократное добавление индуктора не приводило к постоянно высоким скоростям экспрессии. Это вызвано быстрым потреблением маннозы-индуктора, так как она является одним из предпочтительных источников углерода для *B.subtilis*.

Таким образом, настоящая заявка относится к способу получения гетерологического полипептида в неспорулирующей клетке-хозяине *B.subtilis*, включающему этап трансфекции неспорулирующей клетки *B.subtilis* вектором, содержащим промотор manP, оперативным путём связываемый с нуклеотидной последовательностью, кодирующей этот полипептид, выращивание трансформированной клетки-хозяина в среде в подходящих условиях для обеспечения экспрессии указанного полипептида и выделение этого полипептида из этой клетки или из клеточной культуры, посредством чего экспрессия этого полипептида индуцируется добавлением маннозы-индуктора. Согласно предпочтительному варианту настоящей заявки маннозу-индуктор добавляют в начале фазы подпитки при периодическом культивировании. В другом предпочтительном варианте осуществления маннозу-индуктор добавляют в первый раз в начале этапа подпитки при периодическом культивировании, а второе добавление маннозы выполняют во время экспоненциальной стадии выращивания одновременно с вводом глюкозы.

Систему экспрессии с пониженными требованиями к индуктору получали с помощью процесса ферментации 5.3 путём модификации гена manA маннозо-6-фосфат изомеразы. Это приводит к получению системы, в которой требуется меньше индуктора для получения высоких скоростей экспрессии, что можно было отмечать в экспериментах со встряхиваемыми колбами.

Однако эта система сопровождается самоинтоксикацией клеток, так как рост был ингибирован при использовании объёмов свыше 0,5% (вес/объём) маннозы. Этот эффект может быть вызван внутриклеточным накоплением маннозо-6-фосфата. Другая возможная причина чувствительности штамма TQ281 ΔmanA к маннозе может заключаться: в сильном уменьшении доступных фосфатных групп, так как фосфат необратимым путём связывается с маннозой при вхождении в клетки через PTS.

Таким образом, настоящая заявка относится к способу получения гетерологического полипептида в клетке-хозяине *B.subtilis*, которой недостаёт гена manA, включающему этап трансфекции клетки *B.subtilis*, которой недостаёт гена manA, вектором, содержащим промотор manP, оперативным путём связываемый с нуклеотидной последовательностью, кодирующей этот полипептид, выращивание трансформированной клетки-хозяина в среде в подходящих условиях для обеспечения экспрессии указанного полипептида и выделение этого полипептида из этой клетки или из клеточной культуры, посредством чего экспрессия этого полипептида индуцируется добавлением маннозы-индуктора в объёме, не превышающем 0,5% (вес/объём). Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящей заявки манноза-индуктор добавляется в начале фазы периодического культивирования с подпиткой. Согласно другому предпочтительному варианту осуществления манноза-индуктор добавляется в первый раз в начале этапа подпитки при периодическом культивировании, а второе добавление маннозы выполняют во время экспоненциальной стадии выращивания одновременно с вводом глюкозы.

Режим индукции, который больше не нуждается ни в каком индукторе, показан в примере 5.4. Эта система автоиндукции была реализована с помощью штамма ΔmanP TQ356 и вектора экспрессии pMW168.1.

В негативном штамме транспортёра, таком как TQ356, промотор маннозы находится только под регуляторным контролем с помощью системы CCR, осуществляемым глюкозой, как обстоит дело, например, в случае фазы периодического культивирования при процессе ферментации. Устранён отрицательный регуляторный эффект от родственного транспортёра ManP. Тем не менее, регулятор остаётся в неактивном состоянии до тех пор, пока глюкоза присутствует. В дополнение к этому отсутствуют достаточные объёмы ManR, так как сайт-оператор manR заблокирован. До тех пор, пока глюкоза будет не лимитирующей, ManR сможет связываться со своей последовательностью оператора и начинать экспрессию. Эта система автоиндукции сняла необходимость в наличии этого довольно дорогостоящего индуктора, Эта усовершенствованная стратегия индукции является многообещающей для случаев промышленного использования, так как на фазе периодического культивирования не имеет места нежелательная базовая экспрессия и не требуется добавлять никакого индуктора для обеспечения высоких уровней экспрессии в

течение всей фазы периодического культивирования с подпиткой.

В дополнение к этому также могут быть получены высокие скорости экспрессии с высокими уровнями производительности по сравнению с процессами ферментации 5.2 и 5.3. Удалось получить примерно $10 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ рекомбинантного белка (ϵGFP), что соответствует $146 \text{ мг } \epsilon\text{GFP на } \Gamma_{\text{cdw}}$. Этот продукт равномерно распределялся в клетках благодаря своей растворимости, как это могло быть отмечено с помощью флуоресцентной микроскопии и SDS-электрофореза на полиакриламидном геле. Высокая скорость экспрессии, т.е. высокая производительность могла быть сохранена на постоянно высоком уровне до конца этого ферментационного процесса.

Таким образом, настоящая заявка также относится к способу получения гетерологических полипептидов в клетке-хозяине *B.subtilis* с негативным транспортёром, такой, как в клетке, которой недостаёт гена *manP*, содержащему этап трансфекции клетки *B.subtilis* с негативным транспортёром, с вектором, содержащим промотор *manP*, оперативным путём связываемый с нуклеотидной последовательностью, кодирующей этот полипептид, выращивание трансформированной клетки-хозяина в среде в подходящих условиях для обеспечения экспрессии указанного полипептида и выделение этого полипептида из этой клетки или из клеточной культуры, посредством чего экспрессия этого полипептида не индуцируется маннозой, а находится под контролем глюкозы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения гетерологического полипептида в рекомбинантной бактериальной клетке-хозяине, в котором используют рекомбинантную бактериальную клетку-хозяина, катаболизм источников углерода которой находится под контролем углеродной катаболитной репрессии и системы фосфоенолпируват: углеводная фосфотрансфераза и которая генетически модифицирована так, что она не способна деактивировать белок-регулятор транскрипции, специфический для промотора, индуцируемого вторичным источником углерода при отсутствии индуцирующего вторичного источника углерода, и которая содержит вектор экспрессии с гетерологической последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей полипептид, оперативным путём связываемый с промотором, который индуцируется этим вторичным источником углерода и регулируется этим белком-регулятором транскрипции, при этом указанный способ включает в себя этапы выращивания бактериальной клетки-хозяина в среде для культивирования клеток, причём последняя не содержит данного индуцирующего вторичного источника углерода, а содержит первичный источник углерода, индуцирующий экспрессию указанного полипептида этим первичным источником углерода в момент времени, когда концентрация этого первичного источника углерода падает ниже уровня, необходимого для углеродной катаболитной репрессии, и извлечение этого полипептида из этих клеток или из данной клеточной культуры, причём указанную бактериальную клетку-хозяина выбирают из ряда: *Bacilli*, *Chlostridia* и *Escherichia*, указанный белок-регулятор транскрипции положительно регулирует промотор, индуцируемый вторичным источником углерода, а также дезактивируется переносом фосфорилгруппы из фермента ЕП, специфичного к указанному белку-регулятору транскрипции, при этом гетерологический полипептид происходит от человека, млекопитающего или прокариота и/или представляет собой антиген или фермент.

2. Способ по п.1, в котором используется бактериальная клетка-хозяин, в котором с помощью генетической модификации предотвращается деактивация белка-регулятора транскрипции фосфорилированием ферментом ЕП, специфичным к указанному белку-регулятору транскрипции.

3. Способ по п.2, в котором i) в геноме бактериальной клетки-хозяина осуществляют делецию гена, который кодирует фермент ЕП, переносящий фосфорилгруппу, специфичный к указанному белку-регулятору транскрипции, или в котором ii) в геноме бактериальной клетки-хозяина осуществляют генетическую модификацию гена, кодирующего белок-регулятор транскрипции, в результате чего указанный ген теряет способность связывать фосфорилгруппу, переносимую из фермента ЕП.

4. Способ по п.3, в котором в случае i) в указанный вектор экспрессии интегрируют ген, кодирующий белок-регулятор транскрипции, управляющий промотором вектора, или в котором в случае ii) в этот вектор интегрируют генетически модифицированный ген данной бактериальной клетки-хозяина, кодирующий белок-регулятор транскрипции, не способный связывать фосфорилгруппу, перенесённую из соответствующего фермента ЕП.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором культуральная среда содержит казаминокислоты.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором экспрессию полипептида начинают без индукции указанным индуктором.

7. Способ по любому из пп.1-6, в котором к культуральной среде добавляют, по крайней мере, источник углерода в объёме, достаточном для поддержания предварительно заданной скорости роста бактериальной клетки-хозяина без индукции углеродной катаболитной репрессии.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором промотор, индуцируемый источником углерода, представляет собой промотор оперона маннозы и в котором указанный индуцирующий источник углерода представляет собой маннозу.

9. Способ по п.8, в котором этот промотор представляет собой промотор *PmanP* или *PmanR* оперона

маннозы.

10. Способ по п.9, в котором i) в геноме бактериальной клетки-хозяина осуществляют делецию гена, кодирующего *manP* или в котором ii) в геноме бактериальной клетки-хозяина осуществляют генетическую модификацию гена, кодирующего белок-регулятор транскрипции *ManR*, таким образом, что *ManR*, экспрессируемый указанным геном, не способен связывать фосфорилгруппу, переносимую из специфического фермента ЕП.

11. Способ по любому из пп.1-10, в котором указанную бактериальную клетку-хозяина выбирают из *Bacillus*.

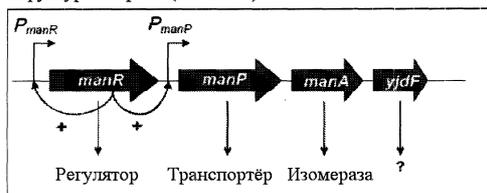
12. Рекомбинантная бактериальная клетка-хозяин, катаболизм источников углерода которой находится под контролем углеродной катаболитной репрессии и системы фосфоенолпируват: углеводная фосфотрансфераза и которая генетически модифицирована так, что она не способна деактивировать белок-регулятор транскрипции, специфический для промотора, индуцируемого вторичным источником углерода при отсутствии индуцирующего вторичного источника углерода, посредством делеции, в геноме этой бактериальной клетки-хозяина, гена, который кодирует переносящий фосфорилгруппу фермент ЕП, специфичный к указанному белку-регулятору транскрипции, и которая содержит вектор экспрессии с гетерологической последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей полипептид, оперативным путём связываемый с промотором, который регулируется этим белком-регулятором транскрипции, для которого данная бактериальная клетка-хозяин генетически модифицирована, чтобы она лишилась способности к деактивации, и в которой в этот вектор экспрессии интегрирован ген, кодирующий этот специфический белок-регулятор транскрипции, причем указанная бактериальная клетка-хозяин выбрана из ряда: *Bacilli*, *Chlostridia* и *Escherichia*, указанный белок-регулятор транскрипции положительно регулирует промотор, индуцируемый вторичным источником углерода, а также дезактивируется переносом фосфорилгруппы из фермента ЕП, специфичного к указанному белку-регулятору транскрипции, при этом гетерологический полипептид происходит от человека, млекопитающего или прокариота и/или представляет собой антиген или фермент.

13. Рекомбинантная бактериальная клетка-хозяин, катаболизм источников углерода которой находится под контролем углеродной катаболитной репрессии и системы фосфоенолпируват: углеводная фосфотрансфераза и которая генетически модифицирована так, что она не способна деактивировать белок-регулятор транскрипции, специфический для промотора, индуцируемого вторичным источником углерода при отсутствии индуцирующего вторичного источника углерода, посредством генетической модификации, в геноме этой бактериальной клетки-хозяина, гена, который кодирует указанный белок-регулятор транскрипции, вследствие чего указанный белок-регулятор транскрипции, экспрессируемый указанным геном, не способен связывать фосфорилгруппу, переносимую ферментом ЕП, специфичным к указанному белку-регулятору транскрипции, и которая содержит вектор экспрессии с гетерологической последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей полипептид, оперативным путём связываемый с промотором, который регулируется этим белком-регулятором транскрипции, для которого данная бактериальная клетка-хозяин генетически модифицирована, чтобы она лишилась способности к деактивации, и в которой в этот вектор экспрессии дополнительно интегрирован генетически модифицированный ген, кодирующий этот специфический белок-регулятор транскрипции, не способный связывать фосфорилгруппу, перенесённую соответствующим ферментом ЕП, причем указанная бактериальная клетка-хозяин выбрана из ряда: *Bacilli*, *Chlostridia* и *Escherichia*, указанный белок-регулятор транскрипции положительно регулирует промотор, индуцируемый вторичным источником углерода, а также дезактивируется переносом фосфорилгруппы из фермента ЕП, специфичного к указанному белку-регулятору транскрипции, при этом гетерологический полипептид происходит от человека, млекопитающего или прокариота и/или представляет собой антиген или фермент.

14. Способ по любому из пп.1-11 или рекомбинантная клетка-хозяин по п.12 или 13, в которых антиген выбран из ряда: гликопротеины, углеводы от микробных патогенов как вирусных, так и антибактериальных, и новообразования.

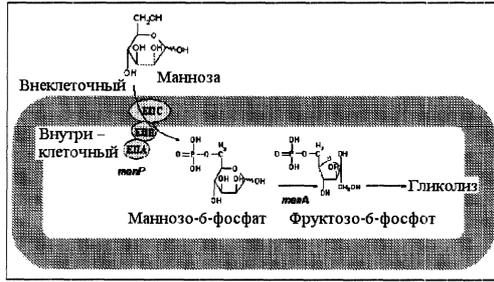
15. Способ по любому из пп.1-11 или рекомбинантная клетка-хозяин по п.12 или 13, в которых фермент выбран из ряда: химозин, протеазы, полимеразы, дегидрогеназы, нуклеазы, глюканы, оксидазы, альфа-амилазы, оксидоредуктазы, липазы, амидазы, нитрил-гидратазы, эстеразы и нитрилазы.

Структура оперона (Маннозы)



Фиг. 1

Катаболизм маннозы



Фиг. 2

```

TTTATATCA TTGGATTAT TAAAACGAGG GATTATTCST TGCTTTTIT
                                     manR -35
GTATAGGGA AAAATGCSIT TATTACCGGA ACSTATGGTA AAAAAAGCGA
                                     -10 +1 EgII
TTTTATGAG CTGATTTCCG TA TACAGTIG AGACAAGATC TTATTATCA
XbaI AFII NdeI
CASTTTCTAG AAATAATTTT CTAAAGAAGG AGATATACAT ATGACACATG
                                     Lysa Bs
    
```

Фиг. 3

```

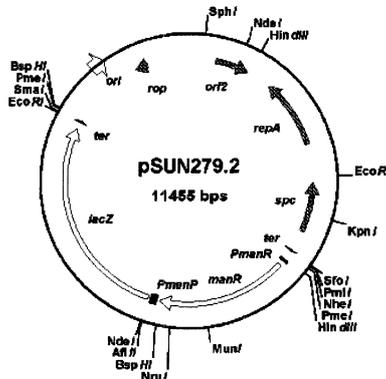
pSUN291 pSUN364.1 pSUN395.2
TGAATTCTG CTGAATATAC ATTACATAGC AAATCAAAG AGTATAAAA
pSUN366.9 HindIII -35
TCGCTTTTIT CCGGAACSTT CCGTAAAAA CGAAACTTIT GTCTCTATGA
PstI -10 +1
TTTTGTITTA TAATGTAAC GGTTCCTAT ATAGTATACT TATACTATCA
>>...CRE...>>
AFII NdeI
ATTTCCTCAA GTAGATACTG ACAGGCTTAA GAAGGAGATA TACATATGAC
                                     lacZ
    
```

Фиг. 4

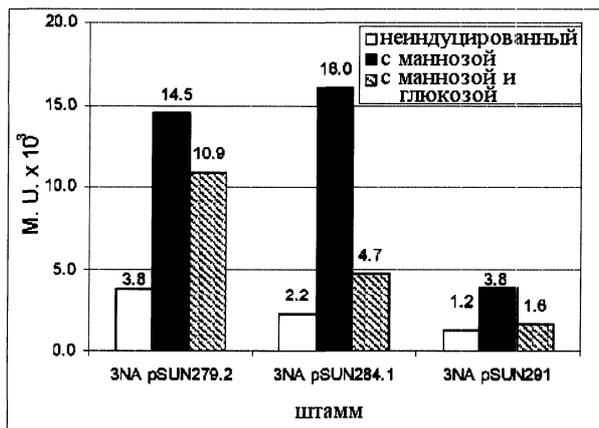
```

HindIII -35
TTTTCCGGA AGCTTCGGTA AAAAACGAAA CTT TTTTCTC TATGATTTTG
-10 CRE +1
TTTTA TAAZY TAAACGGTIT CTATATAGT ATACTTATAC TATCAATTTG
CTCAAGTAGA TACTGACAGG AAGGATAGAA AAACAGATGG AATACATAAA
                                     manR
    
```

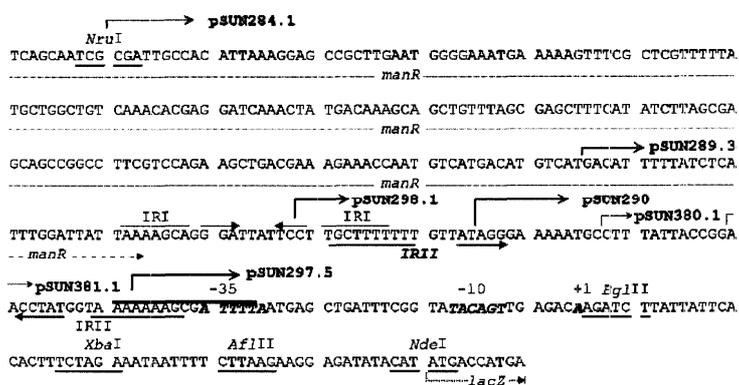
Фиг. 5



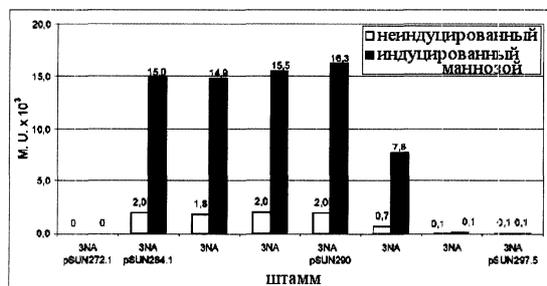
Фиг. 6



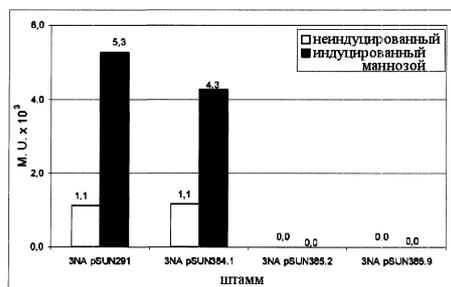
Фиг. 7



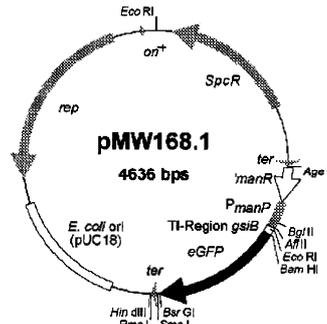
Фиг. 8



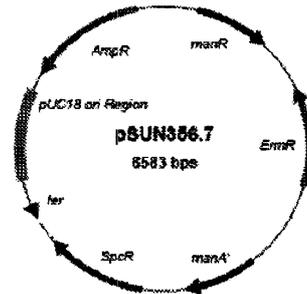
Фиг. 9



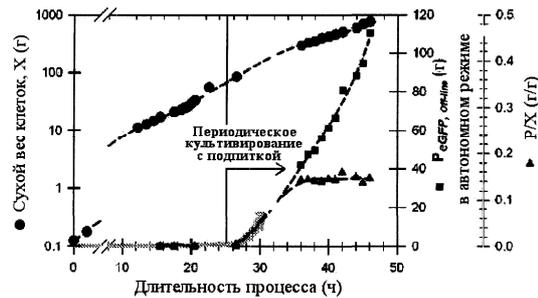
Фиг. 10



Фиг. 11

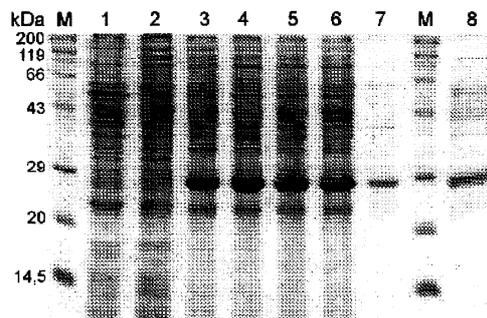


Фиг. 12



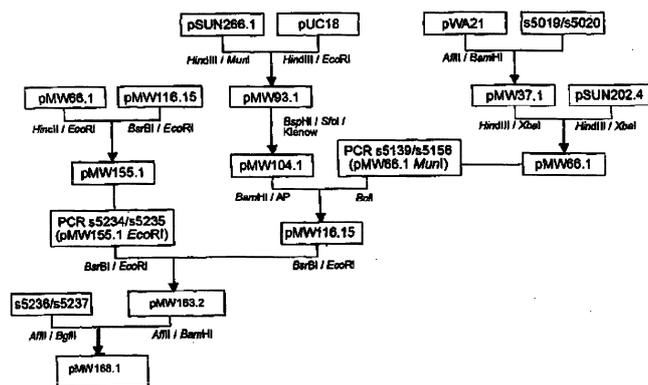
Периодическое культивирование с подпиткой для *B. subtilis* TQ356 / pMW168.1. Сухой вес клеток (X, чёрные круги), общее выработанное количество eGFP (P_{eGFP} , чёрные квадраты) и выход продукта (P/X, чёрный треугольник) отображаются относительно времени ферментации. Начало стадии периодического культивирования с подпиткой указано вертикальной линией

Фиг. 13



Фиг. 14

SDS-электрофорез на полиакрил амидом геле проб клеток, отобранных в ходе ферментации с *B. subtilis* TQ356/pMW168.1. Столбики 108, M: маркер молекулярного веса белка Roti-Mark STANDARD, 1: через 12,5 ч (периодическое культивирование); 2: через 20,5 ч (периодическое культивирование); 3: через 36 ч (13,5 ч периодическое культивирование с подпиткой); 4: через 41 ч (18,5 ч периодическое культивирование с подпиткой); 5: через 44 ч (21,5 ч периодическое культивирование- с подпиткой); 6: через 46 ч (23,5 ч периодическое культивирование с подпиткой, окончание процесса); 7: через 46 ч, нерастворимая фракция; 8: через 46 ч, надосадочная жидкость культуры.



Фиг. 15

