

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ L-АСПАРАГИНАЗ[#]

М.В. Покровская*, С.С. Александрова, В.С. Покровский, Н.Д. Добрякова, А.Н. Шишпаренок,
Ю.В. Гладилина, Д.Д. Жданов

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *e-mail: Ivan1190@yandex.ru

L-аспарагиназа (КФ 3.5.1.1.) — фермент с самым высоким уровнем мирового производства, используемый при лечении онкологических заболеваний, а также в пищевой промышленности. Для производства многих целевых белков используются различные системы экспрессии — от бесклеточных до гиперпродуктивных клеток растений, насекомых, бактерий и млекопитающих. В данном обзоре предпринята попытка обобщить обширные данные по экспрессии гетерологичных генов и технологии производства рекомбинантных L-аспарагиназ.

Ключевые слова: L-аспарагиназа; оптимизация экспрессии; гетерологичная экспрессия; рациональный и компьютерный дизайн; рекомбинантные гены

DOI: 10.18097/BMCRM00265

ВВЕДЕНИЕ

L-аспарагиназы (КФ 3.5.1.1), найденные практически во всех биологических царствах [1-4] — бактериях [5-7], грибах [8-10], растениях [11], археях [12], насекомых и млекопитающих, включая человека [13, 14], участвуют в различных жизненно необходимых для клетки процессах [1, 13-20]. Но наиболее изучено свойство некоторых L-аспарагиназ подавлять рост опухолевых клеток, дезамидируя L-аспарагин или его β-пептиды с высвобождением L-аспартата и аммиака [14, 20-23] (рис.1).

ПЭГилированная (модифицированная полиэтиленгликолем) и рекомбинантная L-аспарагиназа

из *Escherichia coli* и нативная из *Erwinia chrysanthemi* одобрены FDA и включены Всемирной организацией здравоохранения в список основных лекарственных средств [24].

Практическое применение нашли также L-аспарагиназы *Aspergillus niger* и *Aspergillus oryza*, уменьшающие образование канцерогенного акриламида при термической обработке пищевых продуктов [25, 26].

Природные организмы, естественные хозяева целевых генов, синтезируют вещества, представляющие интерес для человека, в достаточных для внутренних нужд клетки, но небольших количествах. Поэтому белки медицинского и промышленного назначения, в основном, получают не из

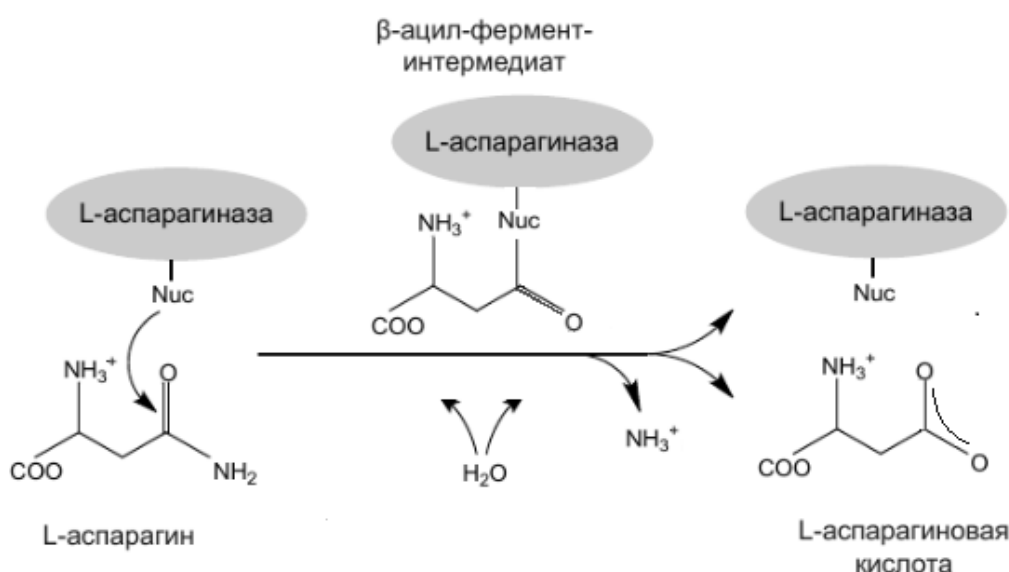


Рисунок 1. Схематическое представление механизма действия L-аспарагиназ. Описание в тексте.

[#]Посвящается памяти профессора Н.Н. Соколова, внесшего существенный вклад в исследования L-аспарагиназ



Рисунок 2. Стратегия гетерологичной экспрессии L-аспарагиназ. Описание в тексте.

природных источников, а путем синтеза их рекомбинантных аналогов в подходящих для этого искусственных генетических системах любого уровня организации (бактериях, дрожжах, растениях, клетках животных и даже микроводорослях). Например, соматостатин и гормон роста человека и некоторых животных, фактор роста эпидермиса человека, фактор некроза опухолей человека и мыши, интерфероны, гормон кальцитонин, миоглобин, гормоноподобные сигнальные белки, интерлейкины, инсулин, трипсин, некоторые онкобелки и т.д. [25, 27-29].

На сегодняшний день проблемы получения рекомбинантных белков, в том числе и L-аспарагиназ, в гетерологичных системах решаются за счет оптимизации генетических конструкций, включающих целевой ген, модификации хозяйского генома и подбора условий культивирования клеток продуцента [25, 30-42] (рис.2).

1. ЦЕЛЕВОЙ БЕЛОК L-АСПАРАГИНАЗА

Традиционно все L-аспарагиназы разделяют по происхождению (бактериальные, растительные, ризобийные [43-45]), локализации (периплазматические или внутриклеточные), сродству к субстрату и четвертичной структуре [1, 44]. При этом учитываются различия в первичной структуре [46, 47], эволюционные связи [48] и особенности аллостерической регуляции [49].

Бактериальные L-аспарагиназы типа I (например, фермент *E. coli*) с относительно низким сродством к L-аспарагину ($K_m \sim 0,05$ мМ) экспрессируются конститутивно, локализуются в цитоплазме и противоопухолевыми свойствами не обладают.

Периплазматический высокоаффинный фермент L-аспарагиназы *E. coli* ($K_m \sim 0,0115$ мМ), много лет используемый при лечении острого лимфобластного лейкоза,

принадлежит ко II типу. Его экспрессия регулируется белком рецептором cAMP, FNR (регулятор фумарат-нитратредуктазы) и зависит от анаэробноза и содержания углерода и азота [50]. Из-за схожести структуры субстратов L-аспарагиназы II типа имеют также небольшую активность по отношению к глутамину и D-аспарагину – около 4% и 5% соответственно по сравнению с ее активностью по отношению к L-аспарагину.

Интересно, что эукариотические дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* также содержат цитоплазматическую и секретируемую аспарагиназы [51]. С учетом новых данных [1, 6, 31, 52] классификация L-аспарагиназ была расширена (рис.3).

Совместимость с регуляторными элементами клетки хозяина, эффективность получения чужеродных аспарагиназ, их ферментативные и терапевтические свойства зависят от их структуры [47, 53-59]. У большинства L-аспарагиназ мономер, состоящий примерно из 330 аминокислотных остатков (а.о.), включает 14 β -цепей и 8 α -спиралей, уложенных в N- и C-концевые домены, соединенные линкером из 20 а.о. [56, 60, 61].

Существуют и другие, менее изученные и, возможно, менее иммуногенные, варианты с короткой первичной последовательностью, например, аспарагиназы из *Proteobacteria bacterium* (GenBank: MBS1182750.1), *Sedimenticola selenatireducens* (NCBI Reference Sequence: WP_144358374.1). Полученная нами L-аспарагиназа из *Rhodospirillum rubrum* содержит всего 172 а.о. и имеет низкую гомологию с «терапевтическими» ферментами из *E. coli* и *E. chrysanthemi* [62].

Активные центры архейных и бактериальных L-аспарагиназ имеют высокую степень сходства, предполагая универсальный механизм гидролиза аспарагина [14, 43, 61, 63-68].



Рисунок 3. Классификация аспарагиназ (адаптировано из [31]). Описание в тексте.

Фермент млекопитающих несколько отличается от бактериального длиной, конформацией линкера, структурой гибкой петли активного центра и наличием дополнительной петли с небольшой спиралью в N-концевом каталитическом домене.

Несмотря на значительное разнообразие первичных последовательностей, L-аспарагиназы имеют высокую степень сходства в третичной и четвертичной структурах; большинство из них активны в виде гомотетрамера с четырьмя активными центрами между N- и C-концевыми доменами двух соседних мономеров [55, 56, 69, 70]. Предполагается, что некоторые ферменты I-го типа, например, из *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus furiosus* могут функционировать как димеры [71, 72], а L-аспарагиназы из *Thermus thermophilus* могут действовать как гексамеры [73], но доказательств в поддержку этой гипотезы пока нет.

Поскольку каталитические сайты аспарагиназ имеют заметное структурное сходство, то причины различий их субстратной специфичности логично искать за пределами активного центра [49, 66-68, 74-77]. Одним из возможных факторов ферментативной активности является наличие аллостерических сайтов, кооперативных и конформационных изменений [43, 47, 49, 65, 69, 70, 73-76, 78-82].

В случае неправильного сворачивания или формирования нерастворимых белковых агрегатов при гетерологической экспрессии возможна потеря стабильности и активности. Белку необходимо снова вернуться в нативную форму, чтобы проявить свои ферментативные свойства [83]. Программа FoldX помогает определить свободную энергию макромолекулы для предсказания стабильности L-аспарагиназ на основе их трехмерной структуры [84, 85].

Терапевтическое использование L-аспарагиназ ограничено множеством побочных эффектов [86, 87], нежелательных физико-химических характеристик

(низких термостабильности, активности и субстратной специфичности и др.) [88-92].

Для преодоления этих проблем и оптимизации производства L-аспарагиназ предложены различные методы биоинформатики и моделирования *in silico*, белковой и геномной инженерии, скрининга, протеомики, геномики, а также поиск альтернативных источников L-аспарагиназ [14, 25, 31-42, 93-115].

В процессе рационального проектирования и дизайна, случайного и направленного мутагенеза были спрогнозированы и улучшены свойства ферментов различного происхождения: повышена стабильность и устойчивость к протеазам [30, 54, 89, 90, 94, 96, 110, 116], субстратная специфичность и активность [117-126], снижена иммуногенность [127-130], и даже добавлено новое свойство – ингибирование теломеразы, вносящее дополнительный вклад в противоопухолевый эффект [131]. Однако, полностью устранить побочное действие изученных L-аспарагиназ (аллергические реакции, панкреатит, проблемы со свёртываемостью крови, повышенный уровень сахара в крови, проблемы с почками, дисфункция печени и др.) пока не удается [24, 66, 75, 78, 97, 117-126].

2. ПРОДУЦЕНТЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ L-АСПАРАГИНАЗ

Несмотря на кажущуюся «искусственность» геном-модифицированных организмов, в основе их создания лежат естественные природные процессы, поэтому функциональную реорганизацию генома продуцента для получения желаемого фенотипа можно рассматривать как его направленную эволюцию в лабораторных условиях с целью оптимизации генной экспрессии и получения наибольшего количества целевого белка. Выбор продуцента зависит от совместимости его экспрессионной системы и целевого

белка, посттрансляционных модификаций, влияющих на растворимость, стабильность и функции продукта [3, 45, 132-137].

Примерно три четверти эукариотических белков и более половины прокариотических белков гликозилированы [138], что добавляет дополнительный «информационный» слой к белкам-реципиентам, модулируя их сворачивание, стабильность, связывание с рецептором, иммуногенность, ферментативную активность и/или локализацию [139, 140]. N-гликозилирование (N-ацетилглюкозамин связан с аспарагином) распространено у эукариот, а также активно происходит у архей, но у бактерий встречается редко. Связь N-ацетилгалактозамина или N-ацетилглюкозамина, фукозы или маннозы с серином или треонином (О-гликозилирование) также встречается в эукариотических клетках и редко у бактерий. При биотехнологическом производстве белков гликозилирование используется для улучшения их терапевтических свойств, продления периода полувыведения [141, 142], повышения стабильности и снижения иммуногенности [143-146].

Сложная третичная структура белков млекопитающих частично зависит от образования дисульфидных связей и может не сформироваться у бактерий [147, 148].

Дрожжи *S. cerevisiae*, а также дрожжи рода *Pichia*, в отличие от бактерий, не продуцируют эндотоксины и способны осуществлять некоторые несложные посттрансляционные модификации: протеолитический процессинг, образование дисульфидных связей и гликозилирование [149, 150], однако гликозилирование, производимое дрожжами, отличается от такового в клетках высших эукариот и может влиять на иммунные реакции у пациентов [151-165].

Модифицированные Glycoswitch® SuperMan5 (och1-1, GAP-mannosidaseHDEL), WT (ATCC® 28485TM), SuperMan5HIS-, SuperMan5pep4- и SuperMan5 (aox1-, Muts) и др. штаммы были использованы для синтеза гликозилированных белков, в том числе L-аспарагиназ из *E. coli*, *E. chrysanthemi* и *S. cerevisiae* и др. [149, 155-157].

Мутанты L-аспарагиназы *E. coli* с частично удаленными сайтами гликозилирования и L-аспарагиназы дикого типа, синтезированные в *P. pastoris*, были более стабильны в сыворотке крови человека по сравнению с негликозилированной L-аспарагиназой. Гликаны Man5GlcNAc2, присутствующие в гликозилированных формах L-аспарагиназ, снижали иммуногенность фермента *in vitro* [158].

Ген L-аспарагиназы из *E. chrysanthemi* был успешно экспрессирован в *P. pastoris* [159].

В работе Effer. и соавт. [160] рекомбинантный фермент из *E. chrysanthemi*, экспрессируемый в штамме Glycoswitch® *P. pastoris*, представлен тремя внеклеточными и гликозилированными активными вариантами, включая две тетрамерные формы (Egw240 (240 кДа) и Egw160 (160 кДа) с удельной активностью 15.71 МЕ/мг и 302.02 МЕ/мг соответственно) и одну мономерную версию (Egw40 (40 кДа) с удельной активностью 48.45 МЕ/мг). Масс-спектрометрический анализ показал, что тетрамеры Egw40 и Egw160 были N-гликозилированы при Asn170, в основном, N-гликанами GlcNAc2Man7. Эти сайты гликозилирования являются частью прогнозируемого иммуногенного Т-клеточного эпитопа, связанного с аллергией на коммерческую L-аспарагиназу из *E. chrysanthemi* у всех

пациентов. По результатам ELISA с гликозилированной L-аспарагиназой из *E. chrysanthemi* можно предположить, что гликаны маскируют белковые эпитопы, снижая иммуногенность, что в перспективе может продлить время лечения [166].

Ferrara и соавт. [149] сообщили о восьмикратном увеличении активности L-аспарагиназы из *S. cerevisiae* при ферментации в *P. pastoris* по сравнению с исходным вариантом.

Экспрессия L-аспарагиназы из *E. coli* с активностью 2,5 МЕ/мл в экспрессионной системе дрожжей PichiaPink™, сопровождалась образованием паттернов гликозилирования, сходных с паттернами млекопитающих [161].

Рекомбинантная L-аспарагиназа *E. coli*, экспрессированная в клетках человека HEK-293, имела молекулярную массу 60 кДа, что больше, чем у L-аспарагиназы, экспрессируемой в *E. coli* (35 кДа) [162]. Анализ N-гликозилирования с помощью программного обеспечения NetNGlyc 1.0 и обработки PGNазой-F показал, что увеличение молекулярной массы является результатом добавления гликанов к белку клетками млекопитающих [163]. Активность гликозилированной L-аспарагиназы при физиологических значениях pH и температуры была сопоставима с активностью негликозилированного фермента.

Природная система экспрессии *E. coli* обычно не осуществляет посттрансляционные изменения, но экономичность, простота генно-инженерных манипуляций и производственных процессов, обуславливают преимущественное использование *E. coli* в качестве хозяина для экспрессии и производства «фармакологических» и «пищевых» аспарагиназ в лабораторных и промышленных масштабах [14, 132, 167-173].

Информация о разработанных доступных штаммах *E. coli*, представлена на веб-сайте Центра прикладной структурной биологии Вольфсона ([http:// wolfson.huji.ac.il/expression/bac-strains-prot-exp.html](http://wolfson.huji.ac.il/expression/bac-strains-prot-exp.html)).

L-аспарагиназа I из *S. cerevisiae*, экспрессируемая в *E. coli* BL21 (DE3), показала хорошую специфичность в отношении аспарагина и цитотоксичность на клетках лейкемии MOLT-4 в физиологических условиях. Удельная активность составила 196.2 МЕ/мг, что соответствует активности коммерческой L-аспарагиназы *E. coli* [79].

Chi и соавт. [174] при использовании *E. coli* BL21 (DE3) для клонирования и экспрессии L-аспарагиназы из *Mycobacterium gordonae* достигли максимальной удельной активности 486.65 МЕ/мг при pH 9.0 и 50°C. В *E. coli* BL21 (DE3) получены и затем очищены L-аспарагиназа из *E. carotovora* (430 МЕ/мг) [175] и *Y. pseudotuberculosis* (62 МЕ/мг) [93].

Dumina и соавт. [176] также использовали *E. coli* BL21 (DE3) для изучения активности экстремофильных L-аспарагиназ из психрофильных грибов *Sclerotinia borealis*, термоацидофильной кренархеи *Acidilobus saccharovorans* и термофильной бактерии *Melioribacter roseus*. Фермент из *M. roseus* был максимально активен (1530 МЕ/мг) при 70°C и pH 9.3. Полученный фермент проявлял дифференциальную цитотоксичность в отношении раковых клеток K562, Jurkat, LNCaP и SCOV-3 [6].

Ген высокоспецифичной в отношении L-аспарагина I L-аспарагиназы II из *Salmonella paratyphi* со значительным

антипролиферативным действием на раковые клетки линии MCF7, A549 и Нер-2 человека был экспрессирован в *E. coli*; его удельная активность составила 197 МЕ/мг [177].

Полученная в *E. coli* BL21 (DE3) устойчивая при высоких температурах L-аспарагиназа из *Thermococcus sibiricus* позволяет использовать ее для снижения содержания акриламида в пищевых продуктах. При этом белок проявляет цитотоксическую активность в отношении раковых клеток K562, A549 и Sk-Br-3 [178].

L-аспарагиназы из термостабильного галотолерантного *Cobetia amphilecti* AM16 (778 МЕ/мг), морской *Pseudomonas aeruginosa* HR03, почвенной *Pseudomonas aeruginosa* CSPA4, L-аспарагиназа II из *Erwinia carotovora* и др. были успешно экспрессированы в *E. coli* BL21 (DE3) [175, 179, 180, 181].

При экспрессии L-аспарагиназы *E. chrysanthemi* наибольшая ферментативная активность во внеклеточной (при наличии N-концевого лидерного пептида) и во внутриклеточной средах была получена в штамме *E. coli* Rosetta (DE3) [182].

Meena и соавт. [183] экспрессировали ген L-аспарагиназы из *Streptomyces griseus* в *E. coli* M15 в оптимизированных условиях культивирования, используя Box-Behnken design. В результате ферментативная активность увеличилась в три раза по сравнению с активностью исходного штамма. Этот же штамм *E. coli* был использован для синтеза L-аспарагиназы из *Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08 с активностью 158.1 МЕ/мл [184, 185].

Для улучшения активности человеческой L-аспарагиназы hASNase-3 Karamitros и Konrad [103] создали библиотеку мутантов, использующих *E. coli* C41 (DE3) в качестве продуцента. *E. coli* с делецией 5 генов, участвующих в производстве L-аспарагина, были использованы для скрининга на основе активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS) и характеристики рационально разработанных мутантных библиотек. При этом учитывалось, что свободный глицин способствует аутопротеолитическому расщеплению и активирует мутантные белки, экспрессируемые в штамме *E. coli*, лишенном биосинтеза аспартата мутантов hASNase-3.

Штамм *E. coli* JM 107 был использован для экспрессии гена L-аспарагиназы из *Bacillus subtilis* [186]. Уровень целевого белка достигал 22 МЕ/мл, что в 2.5 раза выше, чем у *E. coli* JM 107 дикого типа.

Хорошие результаты при пониженной температуре культивирования (16°C) показал модифицированный штамм *E. coli* BL21 ArcticExpress (DE3), экспрессирующий шаперонины. Синтезированная в нем L-аспарагиназа II из *E. coli* обладала правильной укладкой, повышенной удельной активностью и низким содержанием белковых агрегатов [187].

В штамме *E. coli* BL21(DE3) pLysS получены стабильная L-аспарагиназа из *Erwinia Chrysanthemi* 3937 с низкой глутаминазой активностью [188] и L-аспарагиназа из *P. furiosus*.

Удельная активность очищенного фермента достигала 11203.5 МЕ/мг [189].

Chohan с соавт. [190] клонировали и экспрессировали гомолог Pcal_0970 L-аспарагиназы из *Pyrobaculum calidifontis* в *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Полученный

в нерастворимой и неактивной форме рекомбинантный фермент Pcal_0970 был преобразован в активный термостабильный белок.

Максимальная экспрессия L-аспарагиназы из *E. coli* AS1.357 (228 МЕ/мл) наблюдалась в “родном” штамме *E. coli* AS1.357 в отличие от штаммов JM1105, JM109, TG1, DH5α [171].

В работе Zhang X. и соавт. [30] термостабильность и ферментативная активность экспрессированной в *E. coli* BL21(DE3) и *B. subtilis*168 L-аспарагиназы из *Rhizomucor miehei* были значительно улучшены с учетом алгоритма проектирования белков FoldX, программного анализа PyMOL и молекулярной модификации.

В отличие от белков эукариотических клеток, многие белки, полученные в *E. coli*, сохраняют иницирующий а.о. – формилметионин (fMet). Присутствие fMet в белке, который обычно его не содержит, может привести к снижению биологической активности или придать белку дополнительную иммуногенность. Встраивание сигнальной последовательности в кодирующий фермент ген, может способствовать удалению fMet во время протеолитического процессинга, который сопровождает транслокацию новосинтезированного белка через мембрану. В случае коэкспрессии двух субъединиц hASNase3 (человеческого фермента, гидролизующего L-аспарагин), удаление N-концевого метионина β-субъединицы эндогенной метионинаминопептидазой (MAP) имеет решающее значение, поскольку активность L-аспарагиназы зависит от свободного остатка треонина β-субъединицы [80].

Грамположительная бактерия *B. subtilis* рассматривается как условно безопасный продуцент L-аспарагиназ, обеспечивающий секрецию белков во внеклеточную среду, что способствует стабильности белка и облегчает последующие этапы очистки [191-195]

B. subtilis была успешно использована для экспрессии активной и стабильной L-аспарагиназы II *Aliivibrio fischeri* [196], а также перспективной для промышленного применения L-аспарагиназы *Pyrococcus yayanosii* CH1 [197]. Мутантная L-аспарагиназа *Pyrococcus yayanosii* CH1 показала относительно высокую удельную активность (3108МЕ/мг), которая была в 2.1 раза выше, чем у фермента дикого типа.

Более 90% активной рекомбинантной периплазматической L-аспарагиназы II *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428 экспрессировалось в *B. subtilis* WB800N (105 МЕ/мл с удельной активностью 101 МЕ/мг) [198].

Feng и соавт. [199] использовали *B. subtilis* WB600 для усиленной экспрессии L-аспарагиназы II типа из *B. subtilis* 168 за счет оптимизации генетических конструкций (до 407.6 МЕ/мл (2.5 г/л белка).

Гены грамположительных бактерий, как правило, экспрессируются в клетках *B. subtilis*. Однако из-за различия регуляторных последовательностей нуклеиновых кислот и ферментных систем транскрипции и трансляции у грамположительных и грамотрицательных бактерий большинство генов грамотрицательных бактерий, в том числе *E. coli*, не функционируют в *B. subtilis*, хотя гены бацилл в *E. coli* экспрессируются. Например, в рибосомах грамположительных бактерий отсутствует белок S1, обуславливающий связывание молекул РНК с рибосомой и перенос мРНК в сайт декодирования рибосомы. Для

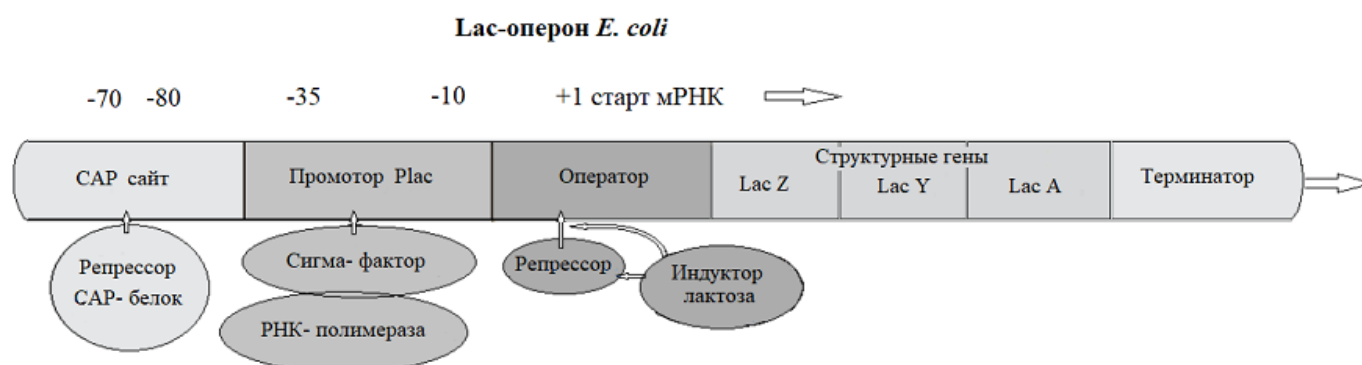


Рисунок 4. Лас-оперон *E. coli*. Описание в тексте.

правильной и эффективной экспрессии чужеродного гена в клетках *B. subtilis*, он должен иметь бациллоподобную последовательность промотора, а на синтезируемой мРНК в участке связывания рибосом должна находиться достаточно протяженная последовательность, комплементарная 3'-концу 16S рибосомной РНК бацилл. Схожим образом организованы гены многих грамположительных бактерий, что и обуславливает их экспрессию в клетках бацилл [200].

Использование растительных систем экспрессии при получении гетерогенных белков затруднено из-за большого количества клеточных протеаз и низкой эффективности производства. Однако, полученный растительный ген L-аспарагиназы *Withania somnifera* в *E. coli* BL21 (DE3) с активностью 17.3 МЕ/мг можно рассматривать в качестве источника и жизнеспособной альтернативы бактериальным ферментам [201].

Производство L-аспарагиназ и других гетерогенных белков зависит не только от выбора хозяина, но и от эффективности системы экспрессии, процесса ферментации, правильности посттрансляционных модификаций и стабильности продукта.

3. ЭКСПРЕССИОННАЯ СИСТЕМА ПРОКАРИОТ-ОСНОВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ L-АСПАРАГИНАЗ

Консервативный базовый набор генетического аппарата прокариот на примере наиболее изученного эталонного представителя *E. coli* включает гены так называемого «домашнего хозяйства», кодирующие белки и РНК, содержащиеся в кольцевой двухцепочечной хромосоме (4 млн пар нуклеотидов), дополнительные элементы, регулирующие репликацию, транскрипцию, трансляцию, пути метаболизма и формирование клеточных структур, а также мобильные элементы, представляющие интерес как возможные носители чужеродных генов (в нашем случае аспарагиназ).

Плазмиды – автономно реплицирующиеся внехромосомные кольцевые или линейные молекулы ДНК аналогичные по структуре линейным хромосомам. В отличие от хромосом, плазмиды являются «необязательным» генетическим материалом. Однако многие крупные плазмиды содержат гены, несущие важную для клетки информацию, например, резистентность к антибиотикам. Некоторые плазмиды и умеренные фаги могут интегрироваться в хромосому клетки хозяина и реплицироваться в ее составе в виде эписомы.

Контроль экспрессии белков *E. coli* осуществляется, главным образом, на уровне транскрипции ДНК. У *E. coli* (в отличие от эукариот) гены, вовлеченные в реализацию одной функции, часто располагаются один за другим и транскрибируются в одной мРНК в виде одного полицистронного транскрипта, с которого в дальнейшем синтезируются отдельные пептиды. Такая организация генов называется опероном и предполагает наличие единой системы регуляции, поддерживаемой системой белков-репрессоров и активаторов, а также низкомолекулярных эффекторов, влияющих на взаимодействие РНК-полимеразы с транскрибируемыми генами. Лас-оперон кишечной палочки служит парадигмой для понимания совместимости и сложной стратегии и регуляции экспрессии «хозяйских» и «чужеродных» генов у прокариот (концепция Жакоба и Моно) [202].

Лас-оперон *E. coli* (рис.4) помимо трех структурных генов, кодирующих ферменты β-галактозидазу, β-галактозидпермеазу и β-галактозидтрансацилазу, принимающих участие в утилизации и метаболизме лактозы, содержит регуляторные элементы – промотор, терминатор транскрипции, сайты связывания регуляторных белков [203-211] (рис.4).

Лас операторы *E. coli* используются для регуляции экспрессии генов L-аспарагиназ из *B. pseudomallei* в плазмиде pGEX-2T [212], *Wolinella succinogenes*, *P. aeruginosa*, *S. cerevisiae*, *S. borealis*, *A. saccharovorans*, *M. roseus* в плазмиде pET28 [6, 105, 126, 176, 213], *R. rubrum* в плазмиде pET23 [62] и др.

Специфичность РНК-полимеразы *E. coli* определяется 7 различными факторами транскрипции (сигма-факторами) и 7 соответствующими типами промоторов. Наиболее часто используемая клеткой *E. coli* промоторная область распознается фактором сигма-70 (молекулярная масса 70 кДа). Yang Wang и соавт. разработали и сконструировали набор промоторов путем комбинирования консенсусных последовательностей -35 и -10, позволяющих попеременно связывать различные сигма-факторы 70, 38, 32 и 24 в зависимости от условий роста клеток-хозяев [214]. При экспрессии в *E. coli* BL21(DE3) синтетический промотор P21285 обеспечивал более высокий выход L-аспарагиназы *E. coli* (asnB) по сравнению с промотором T7. Активность рекомбинантной L-аспарагиназы достигала 3.68 МЕ/мл, 2.61 МЕ/мл и 1.16 МЕ/мл при 20°C, 30°C и 37°C соответственно [214].

Клетки *E. coli* обычно используют в качестве

источника углерода глюкозу. При отсутствии индуктора (лактозы) белок-репрессор связан с оператором, препятствуя соединению РНК-полимеразы с промотором и транскрипции структурных генов Лас-оперона. Появление в среде лактозы инактивирует репрессор, он не соединяется с оператором, РНК-полимераза взаимодействует с промотором и осуществляет транскрипцию полицистронной мРНК. Уменьшение содержания лактозы в результате ее ферментативного расщепления приводит к восстановлению способности репрессора соединяться с оператором и прекращению транскрипции генов.

Промотор *lac* и его производные (UV5, *trc*, *tac* и др.) - ключевой элемент лактозного оперона-индуцируются лактозой или изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозидом (IPTG) и ингибируются глюкозой [215]. Клетки не способны гидролизовать синтетический аналог аллолактозы IPTG, поэтому для эффективной индукции его требуется меньше, что часто используется при производстве Л-аспарагиназ [126, 172, 174, 178, 189, 198, 201] (и др.).

При взаимодействии с cAMP особый катаболитный генактивирующий белок (catabolite gene activation protein, CAP) образует комплекс, способствующий прикреплению РНК полимеразы к промоторному участку генома и началу транскрипции. Уровень cAMP повышается при снижении концентрации глюкозы в среде. Если репрессор не связан с оператором, то в присутствии индуктора при повышении внутриклеточной концентрации cAMP может произойти усиление транскрипции генов, регулируемых *lac*-промотором.

Промоторные элементы бактериальных (*E. coli*) арабинозного и триптофанового оперонов также нашли применение в качестве альтернативы лактозному в плазмидных векторах pBad для получения Л-аспарагиназы *Y. pseudotuberculosis* и *Erwinia carotovora* [93, 216] и pGEX-2T для получения Л-аспарагиназы *Burkholderia pseudomallei* [212] и др.

Эффективные гибридные промоторы *tac* из последовательностей промоторов *trp* и *lac* UV5 *E. coli* позволяют контролируемо экспрессировать чужеродные гены на высоких уровнях.

Небольшие по размеру природные и искусственные плазмиды удобны для модификации, выделения и очистки. Они способны к автономной репликации в клетке-хозяине и при определенных условиях могут быть стабильны в течение длительного времени.

4. СТАБИЛЬНОСТЬ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПЛАЗМИД, НЕСУЩИХ ЦЕЛЕВОЙ ГЕН

Поддержание постоянства организации наследственного материала имеет первостепенное значение для обеспечения нормального развития клетки. В то же время допустимость изменений генома обуславливает генетическое разнообразие вида и имеет важное эволюционное значение. Прокариоты выработали несколько способов исправления ошибок, возникающих в геноме при репликации ДНК, а также для борьбы с попадающими в клетку извне вирусами и мобильными элементами, часто несущими чужеродные гены (в частности, гены Л-аспарагиназ).

Системы рестрикции-модификации расщепляют чужеродную ДНК специфическими рестрикционными ферментами, от действия которых защищена метилированная ДНК клетки-хозяина. Для сохранения гетерогенных белков

применимы продуценты с измененной системой рестрикции-модификации, например, *Str. lividans* [217] и др. Штаммы *E. coli* DH5α (*dam*⁺/*dcm*⁺) использовались для клонирования генов Л-аспарагиназ из *E. coli* AS1.357, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI 1043 [168, 171, 172], BL21(DE3), BLR(DE3) (*dam*⁺/*dcm*[−]) для экспрессии Л-аспарагиназ из *S. borealis*, *A. saccharovorans*, *M. roseus*, *E. carotovora*, *T. sibiricus* и *E. coli* [57, 168, 176, 178, 218 и др.]

Появление чужеродной генетической информации может приводить к рекомбинациям, опосредованным тирозиновыми и сериновыми рекомбиназами, распространенными у бактерий и дрожжей. Генетические перестройки клеток-хозяина могут нарушать экспрессию целевых генов вплоть до их инактивации и удаления, а также могут приводить к структурной нестабильности плазмид [219–222].

RecA-белок играет основную роль в гомологичной рекомбинации и необходим для репарации хозяйской ДНК и избавления от чужеродной. Дефицитные по RecA-белку штаммы *E. coli* XL1-Blue, TOP10, DH5α, JM109, уменьшающие вероятность нежелательной рекомбинации в векторе, несущем целевую ДНК, использовались для молекулярно-биологических работ и экспрессии Л-аспарагиназ из *E. coli* AS1.357 [171], *E. chrysanthemi* [182], морских свинок [223], *Pyrobaculum calidifontis* [224], *Bacillus subtilis* B11-06 [225], *Burkholderia pseudomallei* [212], *Withania somnifera* [201], *Pseudomonas fluorescens* [91], *Rhizomucor miehei* [30]

Модифицированные варианты *recA13*, *recBCD*, *recJ* также используются, но реже.

Возможность направленного сайт-специфического встраивания трансгенов появилась в 2000 г. с использованием химерных Zinc-finger нуклеаз [226, 227] и позже химерных нуклеаз FokI, (Transcription Activator-like Effector Nucleases), обнаруженных у бактерии *Xanthomonas* [228–230]. На основе ассоциированной с нуклеазой Cas адаптивной иммунной системы микроорганизмов CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) был разработан принципиально новый метод адресной доставки и модификации генов и изменения системы их экспрессии [231–240].

Используя устойчивую к лечению аспарагиназой клеточную линию REN подтипа ALL Costa, I. M., с соавт. использовали клоны CRISPR/Cas9 с нокаутом катепсина В для изучения их чувствительности к аспарагиназам из *E. coli* и *E. chrysanthemi*. Авторами показано, что внутренняя экспрессия протеазы CTSB не является механизмом, определяющим устойчивость клеток этой линии к ферментам [241].

Сообщалось о применении CRISPR-Cas9 для геномной инженерии дрожжей (включая *P. pastoris* [242]), *B. subtilis* [243].

4.1. Селекционный маркер для отбора продуцентов Л-аспарагиназ

Селекционный маркер вектора имеет адаптивное значение и обеспечивает избирательное преимущество для трансформантов, например, ауксотрофия или устойчивость к антибиотикам (рис. 5).

Репортерным элементом клонирования белка может служить радиоактивный изотоп или локализация сайта клонирования, например, нарушающая синтез галактозидазы

или токсичного белка ccdB. В качестве селективного маркера при трансформации клеток *P. pastoris* часто используют гены биосинтеза аминокислот HIS4, URA3 и URA5, ADE1, ADE2, ARG4 и MET2, выбор которых зависит от конкретного применения и доступности соответствующих ауксотрофных штаммов [244-246].

В качестве селективного маркера для отбора продуцентов L-аспарагиназы наиболее часто используются гены антибиотикоустойчивости заранее встроенные в экспрессионные плазмиды, например, к ампициллину в векторах pET14b-6×His-EGFP, pET-23, pBAD24, pMA5; к канамицину в векторах pET-30, pET-28 и pET-26; к ампициллину и тетрациклину в векторах pBR322, pET101/D-TOPO, pET-22 [6, 91, 172, 174, 176, 178, 247] (и др.).

4.2. Коммерческие векторы для гетерологичной экспрессии L-аспарагиназы

Важнейшая часть искусственного рекомбинантного вектора - экспрессионная кассета - имеет общие черты с опероном и включает целевой ген и ряд регуляторных модулей, обеспечивающих его надежную экспрессию, выявление и селекционные преимущества полученных трансформантов [247-251] (рис.5).

За последние несколько десятилетий были синтезированы тысячи разнообразных плазмидных и фаговых векторов с разными типами точек начала репликации, разными полилинкерами, селективными маркерами, промоторами, терминаторами, белковыми метками, сигналами секреции и т.д. [252]. Методы конструирования плазмид описаны во многих протоколах, например, Sambrook и Russell [253], Walker и Rapley [254].

К числу векторов, соответствующих системе экспрессии бактерий, относятся pQE70, pQE60 и pQE-9 («Qiagen», Германия); векторы pBS, векторы Phagescript, векторы Bluescript, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A («Stratagene», Германия); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 («Pharmacia», США) и др. Для экспрессии секретируемых белков рекомендуется серия pRIT20 и pRIT30.

Плазмиды типа pRIT30 используются исключительно в *E. coli*, в то время как векторы pRIT20 могут быть использованы как в *E. coli*, так и в *S. aureus*. Общая схема строения плазмидного вектора представлена на рисунке 5.

Плазмиды серии pET («Novagen», Германия) использовали для экспрессии активных L-аспарагиназ из *Thermococcus sibiricus*, психрофильных грибов *S. borealis*, термоацидофильной археи *A. saccharovorans*, термофильных бактерий *M. roseus*, внеклеточной L-аспарагиназы II *E. carotovora*, L-аспарагиназы *E. coli*, *R. miehei*, *Pseudomonas aeruginosa* и др. в штаммах *E. coli* [6, 168, 176, 178, 180, 218, 255 и др.].

Upadhyay и соавт. [57] экспрессировали ген L-аспарагиназы II *E. coli* в pET14b в *E. coli* BL21(DE3) в виде телец включения. Полученный эффект, видимо, зависит от структуры целевого белка, т.к. клонированный в аналогичном векторе pET15b ген L-аспарагиназы из *S. cerevisiae* был экспрессирован в цитозоле *E. coli* BL21 (DE3) в растворимой фракции белков [79].

В исследовании Darwesh и соавт. [212] ген L-аспарагиназы *Burkholderia pseudomallei* был клонирован в



Рисунок 5. Схема строения плазмидного вектора. Описание в тексте

ДНК-плазмиду pGEX-2T и успешно экспрессирован в *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.

Многие пытались создать «универсальный» экспрессирующий вектор для грамотрицательных бактерий. Наиболее удачной была серия векторов с широким диапазоном экспрессии и lac-слияния для грамотрицательных бактерий на основе производных RSF1010 [256]. Экспрессирующие векторы содержали различные промоторы (pNm, plac, ptac и pS1) для экспрессии чужеродных генов.

При экспрессии в *B. subtilis* часто используют векторы pUB110, pLS1, pE194, pAM1, pSB6, pTB19 и pC194 [194]. Плазмиду pBS0E, содержащую промотор P_{xylA}, индуцируемый ксилозой, применяли для синтеза L-аспарагиназы II *A. fischeri* в *B. subtilis* [196].

Сверхэкспрессия стабильной L-аспарагиназы из непатогенного штамма *B. subtilis* B11-06 в *B. subtilis* 168 была получена с использованием челночного вектора pMA5 [225].

Ген, кодирующий L-аспарагиназу II из *P. carotovorum* MTCC 1428, был клонирован в вектор pHT43 и трансформирован в *B. subtilis* WB800N. Использование полученного трансформанта повышало продукцию фермента в три раза по сравнению с нативным штаммом [198].

Li и соавт. [33] сконструировали эффективную синтетическую систему экспрессии L-аспарагиназы *P. yayanosii* CH1 для повышения уровня транскрипции и скорости трансляции гена L-аспарагиназы в *B. subtilis* с помощью плазмиды pMA5, под промотором P₄₃ и дизайна сайта связывания рибосом с помощью RBS Calculator (<https://www.denovodna.com/software/>). Активность L-аспарагиназы после оптимизации ферментации составила 5278 ME/мл и являлась одной из самых высоких, описанных в литературе.

Основу большинства дрожжевых векторов составляет высококопийная плаزمид *E. coli* pBR322 [257]. Для экспрессии внутриклеточных секреторных белков в *P. pastoris* «Life Technologies» (США) предлагает ряд стандартных векторов с конститутивным (PGAP) и индуцируемыми промоторами (PAOX1, PFLD). «BioGrammatics» (США) предлагает векторы GlycoSwitch®, разработанные для гликозилирования целевых белков, и владеет лицензиями

на продажу стандартных экспрессирующих векторов и штаммов *P. pastoris* [154]. «Invitrogen» (США) предлагает плазмиды pAO815, pPIC9K и pPIC3.5K для *P. pastoris* [258].

Популярными векторами *P. pastoris* для экспрессии гетерологичных белков являются pGAPZ, pHIL-S1, pPIC9K, pJL-SX, pBLHIS-SX, pPICZ, pHIL-D2, pJL-IX и pBLHIS-IX.

Типичные векторы, совместимые с экспрессией в клетках млекопитающих, включают в себя систему E-027 pCAG Козак – Шерри (L45a, pREP, pCEP4 («Invitrogen»); pMC1neo, pXT1, pSG5 («Stratagene»); EBO-pSV2neo, pBPV-1, pDBPVMmTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pIZD35, вектор экспрессии кДНК Окаяма - Берг pCDV1 («Pharmacia»); pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 («Invitrogen»); pcDNA3.1, pSPORT1 (GIBCO BRL), pGEMHE («Promega», США); pLXIN, pSIR, pIRES-EGFP («Clontech», США); pEAK-10 («Edge Biosystems», США); pTriEx-Hygro («Novagen») и pCIneo («Promega»). К числу предпочтительных эукариотических промоторов относятся PwLNEO, pSV2CAT, pOG44, pZT1, Psg («Stratagene») и pSVK3, pBPV, pMSG и Psvl («Pharmacia»).

При использовании вектора pAdTrack-CMV («Addgene», США) успешно получили N-гликозилированную рекомбинантную аспарагиназу бактериального происхождения в клетках человека HEK-293 [162].

4.3 Промоторы, применяемые в экспрессионных векторах для наработки L-аспарагиназ

В геноме *E. coli* присутствует около 2500 природных и гибридных промоторных последовательностей – ключевых регуляторных элементов, контролирующих уровень экспрессии генов (рис. 5). Часть из них, а также синтетические и гибридные промоторы, включая полученные из бактерий и бактериофагов, применяются в плазмидных векторах для получения целевых белков, в том числе L-аспарагиназ [39, 203, 259, 215, 260].

Легко регулируются арабинозный araPBAD и рамнозный ghaPBAD промоторы. Под контролем промотора araBAD создана стабильная система экспрессии генов L-аспарагиназ из *Y. pseudotuberculosis* и *Erwinia cartovora* в клетках *Escherichia coli* BL21 (DE3) [93, 216].

Ген L-аспарагиназы из *B. subtilis* был клонирован в вектор blunt pJET1.2 и экспрессирован под контролем промоторов T7 или lacUV5 в *E. coli* JM 107 (полученная активность– 22 МЕ/мл) [186].

Существуют промоторы, реагирующие на изменение pH и ионной силы [261–263]. Wang и соавт. [214] разработали эффективные промоторы для повышения производства L-аспарагиназы в *E. coli* BL21 (DE3), проявляющие высокую стабильность в различных условиях (температура, pH, осмотическое давление).

Менее изучены промоторы, реагирующие на холод и способствующие эффективной экспрессии генов при пониженных температурах [264–266].

Теоретически, промотор для эффективного синтеза целевого белка должен быть сильным и обеспечивать накопление белка от 10% до 30% или более от общего количества клеточного белка, иметь низкий базальный уровень экспрессии (жесткая регуляция), легко переноситься в другие штаммы, а его индукция должна быть проста и экономична [251, 267]. Но практически транскрипция с сильных промоторов или неполное подавление системы

экспрессии могут дестабилизировать плазмиды, снижать скорость роста клеток и продукцию рекомбинантного белка [268–271].

В природе известно свойство чужеродного рекомбинантного гена, управляемого сильным конститутивным промотором или встроенного в геном в большом числе копий, «замолкать» по механизму косупрессионного сайленсинга («gene silencing») [272].

Сверхпродукция белков под эффективным, но нерегулируемым промотором гена β-лактамазы (ген устойчивости к ампициллину в составе плазмиды pBR322) может привести к истощению метаболических ресурсов хозяйского организма и даже оказаться губительным (колицины, эндо- и экзонуклеазы, протеиназы, токсичный белок ротавируса VP7 и т.п.) [273–278].

Избыточный синтез рекомбинантных белков иногда индуцирует клеточную стресс-реакцию (cell stress reaction, CSR), которая подавляет ключевые гены метаболических путей, приводит к замедлению клеточного роста и снижению экспрессии целевых генов. Выключение некоторых генов, экспрессия которых повышается после индукции, в *E. coli* обеспечило более высокую экспрессию гетерологичных белков, в том числе L-аспарагиназ [279, 280].

С помощью биологического и биоинформатического анализа было установлено, что гены, регулируемые *fis*, такие как *carB*, *fadB*, *nrfA*, *narH* и *queA*, активируются во время стационарной фазы и их можно рассматривать как возможные мишени для модуляции метаболической активности и способности к экспрессии белка. Коэкспрессия с *fis* значительно повышала содержание L-аспарагиназы в культуральной среде [281].

Транскриптомный анализ постиндукционных культур *E. coli*, экспрессирующих рекомбинантную L-аспарагиназу, выявил подавление критических генов, многие из которых находятся под контролем глобального регулятора Lgr, оказывающего значительное влияние как на метаболизм аминокислот, так и на трансляцию белка. Тест-культура с дополнительной плазмидой, экспрессирующей Lgr под действием арабинозного промотора, и противодействующая негативным эффектам клеточной стресс-реакции, дала на 50% больше рекомбинантной L-аспарагиназы, чем контрольная культура с одной плазмидой, экспрессирующей рекомбинантный белок [282].

Для смягчения негативных последствий стресс-реакции при экспрессии L-аспарагиназы в *E. coli* в штаммах *E. coli* BW25113 и W3110, несущих экспрессионные плазмиды pBAD33-GFPp и MAL-p2X под промотором tac, Sharma и соавт. [283] сделали четыре основных двойных нокаута (Δ*elaA* + Δ*cysW*, Δ*elaA* + Δ*cueR*, Δ*cysW* + Δ*purL* и Δ*yabI* + Δ*cysW*) и шесть основных одиночных нокаутов (контрольный штамм, Δ*purL*, Δ*elaA*, Δ*cysW*, Δ*cueR*, Δ*cysJ* и Δ*yfbN*), включенных в CSR генов. Активность двойного мутанта Δ*elaA* + Δ*cysW* была выше более чем в 2 раза по сравнению с контрольным штаммом. Более высокие уровни экспрессии L-аспарагиназы были отмечены у вариантов BW25113Δ*elaA*Δ*yhbC* и BW25113Δ*cysJ*Δ*yhbC*.

Обойти нежелательные явления метаболической перегрузки можно с помощью частичной индукции, жесткой регуляции промоторов, низкой температуры культивирования клеток, а также создания сложных систем «перекрестной регуляции» [284–288].

Промоторы разных бактерий довольно близки по строению и способны инициировать транскрипцию при переносе в другой вид бактерий, правда, как правило, с пониженной эффективностью. В результате возрастает не только стабильность и количество рекомбинантного белка, но и клетка хозяина не испытывает возможных токсических эффектов от накопления чужеродного белка [167, 215].

Весьма эффективны и специфичны фаговые промоторные последовательности (T7, T5, T3, SP6, pR, pL, jX174). Оптимизированная промоторная система бактериофага T7lac обеспечивала более высокий уровень транскрипции целевых генов, в том числе кодирующих L-аспарагиназу по сравнению с промоторными системами trc, tac [168, 289, 290].

При выборе промотора T7 (коммерческие экспрессионные системы pET, pRSET, pCal и др.) важно учитывать его совместимость с экспрессионной системой продуцента. В отличие от вирусных промоторов λ L, λ R и T5, промотор T7 находится под контролем собственной профаговой РНК-полимеразы T7 (RNAP) [291–293]. Ген РНК-T7 полимеразы может быть интегрирован в вектор или хромосому хозяина в виде профага (λ DE3) и находится под управлением индуцируемого промотора, например, lac. Синтезированная RNAP в штамме-продуценте *E. coli*, например, BL21 (DE3) может распознавать промотор T7 на плазмиде pET и др. и индуцировать транскрипцию в несколько раз эффективнее, чем нативная РНК-полимераза *E. coli* [167].

Под контролем промотора T7 был экспрессирован ген L-аспарагиназы *P. furiosus* в векторе pET26b(+) в *E. coli* BL21(DE3) pLysS [189]. Синтез гомолога L-аспарагиназы TK1656 из *Thermococcus kodakaraensis* также регулировался промотором T7 (плазида pET) [294].

Khushoo и соавт. [290] экспрессировали ген секреторной L-аспарагиназы II из *E. coli* под промотором T7 lac в штамме *E. coli* BLR (DE3).

Работа промотора pL или pR регулируется репрессорным белком cI бактериофага λ , содержащим температурочувствительную мутацию и сохраняющим свою нативную конформацию, и, следовательно, способность подавлять синтез РНК только при перmissive температуре (~ 28–30°C). Повышение температуры до 42°C вызывает инактивацию белка-репрессора и транскрипцию гена, кодирующего целевой белок.

L-аспарагиназу из *E. coli* AS1.357 успешно экспрессировали в различных штаммах *E. coli* с использованием вектора pBV220, содержащего термочувствительные промоторы бактериофага λ pR pL [171]. Для преодоления проблем, связанных с использованием pL-промотора при крупномасштабном производстве белковых продуктов, была разработана двухплазмидная система. Ген репрессора cI поместили под контроль trp-промотора и включили в малокопийную плазмиду, что обеспечило невысокий уровень синтеза репрессора. Вторая плазида содержала клонированный ген, находящийся под контролем pL-промотора. В отсутствие триптофана включается trp-промотор и синтезируется репрессор cI, выключающий pL-промотор. И, наоборот, при наличии триптофана trp-промотор выключается, репрессор не синтезируется, а pL-промотор активируется. Таким образом, двухплазмидные системы позволяют получать белковые продукты с помощью

рекомбинантных микроорганизмов в промышленных масштабах и относительно недорого [295]

Yang и соавт. [296] разработали набор инструментов PLICable, позволяющий за один этап клонирования и экспериментального скрининга идентифицировать из десяти IPTG-индуцируемых промоторов (T7, A3, lpp, tac, rac, Sp6, lac, npr, trc и syn) наиболее подходящий для производства белка.

Векторы pQE («Qiagen»), несущие T5 промотор, контролируемый lac оператором, успешно использовались при синтезе в *E. coli* термостабильной L-аспарагиназы из *C. amphilecti* AMI6 [179] и L-аспарагиназы из *S. griseus* NIOT-VKMA29 [183].

Для производства чужеродных белков в дрожжах используются индуцируемые галактозой промоторы GALI, GAL7 и GALIO, индуцируемый добавлением ионов меди в среду промотор металлотионеина (MT), а также терморегулируемые варианты двух сильных дрожжевых промоторов (TPI1 и ADH2). Для экспрессии в *P. pastoris* существуют промоторы AOX1, GAP, FLD1, ICL1, YPT1, NPS, PEX8, YPT7, PDAS2, PGCW14 rpsD, PGK, lepA, vegI [152, 297, 298] но, в основном, применяются индуцибельный строго регулируемый промотор AOX1 [258, 299] и конститутивный промотор GAP [300]. Промотор алкогольоксидазы I (AOX1) вовлечен в выработку фермента, участвующего в метаболизме метанола и превращении его в формальдегид. Когда метанол является единственным источником углерода, AOX1 используют для стимулирования гетерологичной экспрессии, в том числе для продукции L-аспарагиназ [149, 155, 157, 158, 160, 301, 302].

Промотор гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAP) *P. pastoris* может регулировать экспрессию в клетках, растущих не только на токсичном метаноле, но и на глюкозе или глицерине. Однако применение конститутивного промотора GAP ограничено при экспрессии токсичных белков [258].

Поскольку природные промоторы не имеют гибкой настройки уровня экспрессии, были предприняты попытки создания улучшенных вариантов конститутивных (PGCW14), регулируемых (PGTH1, PCAT1) и двунаправленных промоторов, обеспечивающих оптимизацию совместной экспрессии нескольких генов [298, 303].

Синтез активной и стабильной *A. fischeri* L-аспарагиназы II был осуществлен в *B. subtilis* с использованием плазмиды pBS0E, несущей ксиллоиндуцируемый промотор PxyIA и репрессорную последовательность XylR [196]. Активность фермента в биореакторе достигала 1.539 МЕ/мл.

Yang и соавт. [304] идентифицировали и охарактеризовали фазозависимые промоторы *B. subtilis*, индуцируемые температурой и pH. Из 114 эндогенных фазозависимых промоторов на основе модулирования их транскрипционной способности и модификации ДНК сконструирована библиотека промоторов, имеющая большой потенциал для применения в производстве гетерогенных ферментов.

Усиление экспрессии гена *B. subtilis* 168 L-аспарагиназы II в *B. subtilis* WB600 было получено после замены промотора Hra II более сильным конститутивным промотором p43 в комбинации с собственным RBS [199].

Уровень транскрипции гена L-аспарагиназы *P. yamanosii* CH1c промотором p43 был в восемь раз выше, чем у pHraII

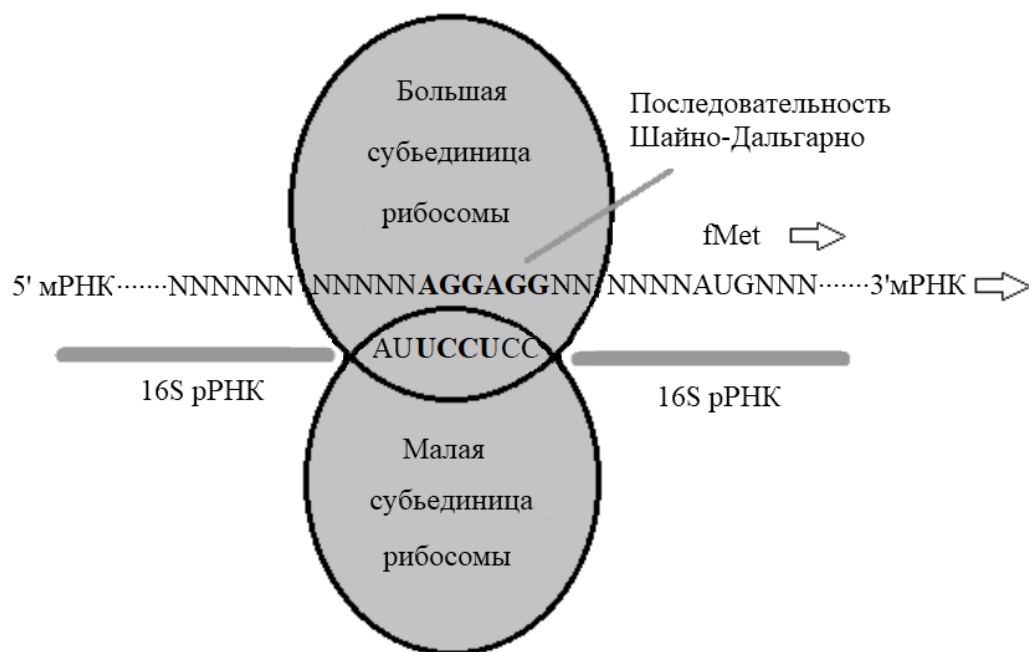


Рисунок 6. Инициация трансляции у бактерий. Описание в тексте.

в *B. subtilis* [33].

Niu и соавт. [305], используя RBS calculator v2.0 («SalisLab», США) и опыт Li и соавт. [33] внедрили эффективную систему двойных промоторов на основе промоторов PuvyD, P43, PaprE и PspVG и оптимизировали основные области (-35 и -10 боксов) при синтезе L-аспарагиназы I из *Bacillus licheniformis* Z-1 в *B. subtilis*. Двойной модифицированный промотор PaprE-PuvyD повышал активность фермента до 568.59 Ед/мл. При замене RBS промотора PuvyD активность L-аспарагиназы достигла 790.1 МЕ/мл, что в 2.27 раза выше, чем у исходного штамма с промотором P43.

Двойной промотор Pdual3 (соединение промоторов PykzA с P43) значительно усиливал метаболические пути и экспрессию генов у *B. licheniformis* [306].

4.4. Ориджин репликации (ori)

Ориджин репликации (ori) – необходимый элемент инициации репликации плазмидного вектора (рис. 5). Это АТ-богатая последовательность ДНК, обуславливающая также совместимость с другими векторами и определяющая количество копий данной плазмиды в клетке (1-200 и более) [307].

Векторы, применяемые для экспрессии белков в клетках *E. coli* и *B. subtilis*, чаще всего имеют ослабленный контроль репликации [308], что может приводить к чрезмерной экспрессии чужеродных генов и снижению жизнеспособности клеток [269]. Контролируемая копияность плазмид позволяет уменьшить базальный уровень транскрипции и более тонко регулировать экспрессию гена.

Плазмиды могут содержать несколько ori-сайтов, функционирующих в разных организмах-хозяевах или в одном штамме, но в разных условиях.

Для усиления экспрессии генов можно увеличить их количество в клетке не только путем увеличения копияности рекомбинантных плазмид, но и путем увеличения числа копий гена в составе плазмиды или в хромосоме хозяйской

клетки. Так, шесть клонов, несущих разное количество копий генов L-аспарагиназы из *Rhizomucor mihei* в векторе pCC1, были исследованы в *P. pastoris*. Вариант с тремя интегрированными копиями экспрессионной кассеты имел максимальный уровень продукции [309].

4.5. Старт-кодон и сайт связывания рибосом (RBS)

В прокариотических клетках инициация трансляции является сложной скоростью-лимитирующей стадией в биосинтезе белка [310-312].

Для начала трансляции требуется наличие в мРНК старт-кодона и расположенной перед ним 5'-нетранслируемой области, содержащей участки связывания рибосом (RBS – ribosome binding site, SD) – последовательность Шайно-Дальгарно (у эукариот – последовательность Козак) [312-315] (рис. 6). Консенсусная последовательность AGGAGG Шайна-Дальгарно комплементарна 3'-концу 16S РНК малой субъединицы рибосомы и располагается на расстоянии от 5 до 13 оснований до иницирующего старт-кодона [311].

В экспрессионных векторах обычно используют RBS активно экспрессируемых генов *E. coli* или бактериофагов. Например, в семействе экспрессионных векторов рЕТ-системы применяют сайт связывания рибосом гена 10 бактериофага Т7. Обычно последовательность RBS включают в состав самого вектора вместе с иницирующим кодоном [316].

Изменение даже нескольких оснований последовательности Шайно-Дальгарно, а также ее расположения относительно стартового кодона существенно сказываются на эффективности связывания мРНК с рибосомой а значит, и на частоте событий инициации трансляции [317-322].

Доступный онлайн-калькулятор RBS [323], позволил выбрать оптимальный мутантный RBS из 300 последовательностей для синтеза *P. yayanosii* CH1 L-аспарагиназы в *B. subtilis* [33]. Повышение транскрипции в 2 раза (общая активность 5278 МЕ/мл) по сравнению с

исходным штаммом было достигнуто с использованием промотора P43 и оптимизации синтеза в ферментере.

Модификация 5'-нетранслируемой области при экспрессии мутантной L-аспарагиназы A344E из *R. miehei* также привела к увеличению ферментной активности в 1.5 раза, по сравнению с диким типом. [324].

Для *E. coli* кодон АТГ обеспечивает инициацию транскрипции и эффективную трансляцию в 83 % случаев. Частота использования GTG – 14 % и TTG – 3 % [311, 325]. На инициацию трансляции влияют и последовательности, расположенные непосредственно за стартовым кодоном [326].

Образование вторичных структур в транскрипте мРНК влияет на эффективность инициации трансляции [313, 327-331].

4.6. Сайт множественного клонирования (MCS)

Чужеродный ген, кодирующий небольшие пептиды (например, соматостатин), может быть встроен внутрь структурного гена или за геном хозяина благодаря природному феномену перекрывания сайтов терминирования и инициации трансляции оперона. В этом случае экспрессия гетерологичного гена будет находиться под контролем регуляторных элементов клетки хозяина. Но в известных экспрессионных векторах для клонирования L-аспарагиназ используются различные полилинкеры – сайты множественного клонирования (MCS), распознаваемые различными ферментами рестрикции [332] (рис.5). В современных плаزمидх MCS сайт часто располагается вблизи универсальных последовательностей. Например, в векторах семейства pUC множественный клонирующий сайт фланкирован участками, комплементарными праймерам M13 (прямому и обратному). Это дает возможность использовать универсальную пару праймеров для секвенирования любого гена, расположенного между этими участками. В некоторых плазмидных векторах встраивание клонируемого гена осуществляется путем гомологичной рекомбинации (gateway cloning), позволяющей проводить переклонирование целевого фрагмента в серию разных экспрессионных плазмид без применения эндонуклеаз рестрикции.

4.7 Стоп-кодон и участок терминирования транскрипции

Универсальными для всех живых организмов сигналами прекращения транскрипции являются расположенные ниже кодирующей последовательности стоп-кодоны TAA, TAG и TGA (в мРНК UAA, UAG и UGA соответственно) (рис.5). В *E. coli* предпочтение отдается стоп-кодону TAA (63%), для TAG – 29 % и около 8% для TGA [333, 334].

Эффективность терминирования трансляции в *E. coli* зависит также от четвертого нуклеотида, следующего непосредственно за стоп-кодоном от 80% (UAAU) до 7% (UGAC) [335, 336].

Терминирующие последовательности не обладают 100 % эффективностью, поэтому в некоторых коммерческих векторах включают вставку всех трех стоп-кодонов для надежности завершения транскрипции.

В плазмидных векторах наиболее часто применяются терминирующие последовательности T7 бактериофага

(все pET векторы, используемые при производстве L-аспарагиназ), T1 и T2 терминаторы (производные гена *gtnB*, кодирующего рРНК *E. coli*) [337, 338].

У прокариот терминирование транскрипции осуществляется двумя способами: Rho-зависимая терминирование транскрипции зависит от гексамерного белка rho, высвобождающего рРНК-транскрипт. В плаزمидх, применяемых для экспрессии белков в клетках *E. coli*, обычно используют только rho-независимые терминирующие последовательности. Шпильчатые структуры, возникающие в синтезирующейся мРНК, заставляют рРНК полимеразу отделяться от ДНК и высвобождать мРНК [339, 340].

Есть данные о дополнительных элементах внутреннего преждевременного прекращения или задержке синтеза цепи мРНК в определенных сайтах ДНК-аттенуации (например, в триптофановом и *lac* опероне *E. coli* [341, 342]). Существование сильных сайтов задержки транскрипции внутри клонированного гена может иметь серьезные последствия для экспрессии, поэтому их стараются избегать и включать антитерминационные элементы, обеспечивающие полную элонгацию мРНК. Антитерминирование транскрипции – сложный процесс, включающий в себя множество известных и пока не идентифицированных факторов [340, 343, 344].

4.8 Оптимизация кодонов для улучшения экспрессии L-аспарагиназ

В связи с вырожденностью генетического кода одну и ту же аминокислоту (за исключением Met и Trp) могут определять несколько кодонов. Частота встречаемости синонимических кодонов различается у разных организмов и декодируется рибосомами с разной скоростью, так как соответствующие им тРНК также присутствуют у разных организмов в разных количествах [345-355]. Коэкспрессия “редкого” гена тРНК может скорректировать синтез белка. Штамм *E. coli* Rosetta (DE3) подходит для «универсальной» трансляции т.к. содержит 7 дополнительных тРНК для редких кодонов, которые обычно не используются в *E. coli*. Этот штамм продемонстрировал самый высокий уровень экспрессии секретируемой L-аспарагиназы из *Erwinia chrysanthemi* по сравнению со штаммами XL1-Blue, TOP10, BL21(DE3), BL21(DE3)Star, WT 5600, BL21(DE3)pLysS [182].

Кодоновое смещение может регулировать экспрессию генов, влияя на эффективность транскрипции, трансляции, сворачивание и активность белка. Оптимизация кодонов с учетом “смещения” обычно приводит к усилению экспрессии рекомбинантных генов (до 1000 раз), но иногда наблюдается и снижение [347, 356-360].

Оптимизация кодонов была использована для создания синтетического гена L-аспарагиназы из гипертермофильного архея *T. sibiricus*. В оптимизированной последовательности процентное содержание GC изменилось с 38.5% до 50.18%, что, в принципе, может привести к изменению стабильности вторичной структуры мРНК, но, оказалось, что только синтетический ген в составе вектора pET-28a(+) был способен к гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli* BL21 (DE3) и обеспечивал высокий выход активного фермента в штаммах-хозяевах [178].

Экспрессия оптимизированного гена L-аспарагиназы из *Zyomonas mobilis* приводила к накоплению целевого

белка (внутриклеточно (3.6 МЕ/мл) и внеклеточно (0.13 МЕ/мл)) в гораздо больших количествах, чем нативного в *E. coli* BL21(DE3)/pET26b [361].

Удельная активность синтезированной L-аспарагиназы из *E. chrysanthemi* с оптимизированными кодонами в *E. coli* BL21 после индукции и очистки достигла 312.8 МЕ/мг и значительно превышала контрольную [113].

Оптимизированные по кодонам мутанты L-аспарагиназы *E. chrysanthemi* с низкой L-глутаминазой активностью и меньшим количеством побочных эффектов (E63Q, Ser254N(Q)) были созданы в векторе His6-SUMO-pET14b в *E. coli* [66]. Фермент сохранял способность убивать лейкозные клетки.

Пока неясно, каким образом синонимичные замены кодонов влияют на фолдинг и свойства белков, но показано, что не только множественные, но даже и единичные замены могут изменять функциональность белков, взаимодействие с лекарствами и ингибиторами, фосфорилирование, чувствительность к протеолизу [351, 362] и агрегационную способность [358, 363, 364]. В отдельных случаях синонимичные замены приводят к образованию совершенно иной третичной структуры белка [359, 365].

Подобные эффекты характерны не только для бактериальных, но и для эукариотических систем экспрессии. Предполагается, что структурные и функциональные изменения связаны с фолдингом полипептидной цепи, происходящим одновременно с трансляцией. Оптимизация кодонов приводит к тому, что участки, ранее соответствующие редким кодонам и синтезировавшиеся значительно медленнее, начинают быстро покидать рибосому. В результате ключевые районы полипептидной цепи, отвечающие за правильную третичную структуру, не успевают пространственно сблизиться для взаимодействия друг с другом, что приводит к неправильному фолдингу. Если это предположение верно, синонимичские замены являются «вторичным кодом», определяющим сворачивание белка [359, 363].

Генетическая экспрессия может быть искажена позиционными эффектами, кластеризацией или вкраплением редко используемых кодонов, вторичной структурой мРНК [366, 345].

Эволюционное значение паттернов использования кодонов, а также механистические эффекты их использования были рассмотрены многими исследователями [345, 367-373].

Частоту использования синонимичских кодонов и процент встречаемости GC в генетическом коде более чем у 35000 организмов можно узнать на сайте базы Codon <http://www.kazusa.or.jp/codon/>.

С использованием программ Sherlock и General Codon Usage Analysis (GCUA) (<ftp://ftp.nhm.ac.uk/pub/gcu>) в структуре L-аспарагиназы были обнаружены и исследованы пять необычных редких кодонов Lys195, Leu30, Lys184, Lys160 и Lys174, которые могут влиять на структурные и функциональные свойства белка. Установлена связь Asp6, Asp77 и Thr78 с активным центром фермента. Методом молекулярного докинга AutoDock выявлены аминокислоты, схожие с сайтом связывания субстрата L-аспарагиназы *E. carotovora* [374]. Кодонный состав трёх экстремофильных L-аспарагиназ, продуцируемых психрофильным грибом *S. borealis*, термоацидофильной кренархеей *A. saccharovorans* и термофильной бактерией *Melioribacter roseu* был оптимизирован с использованием подхода

Twist Codon Optimization («Twist Bioscience», США). При экспрессии в *E. coli* BL21 (DE3) активность L-аспарагиназы *S. borealis* достигала 0.6 МЕ/мл при 24°C и pH 9.6, L-аспарагиназы *A. saccharovorans* – 2.6 МЕ/мл при 94°C и pH 5.2 и L-аспарагиназы *M. roseu* – 9.6 МЕ/мл при 37°C и pH 9.6 [176].

Кодоны гена L-аспарагиназы II *E. coli* были оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих HEK-293 через коммерческую службу («Genscript», США). После субклонирования этой последовательности в векторе pAdTrack-CMV («Addgene») и экспрессии была получена гликозилированная форма L-аспарагиназы *E. coli*, проявляющая активность *in vitro* при физиологических значениях pH и температуры [162].

5. СТАБИЛИЗАЦИЯ мРНК ЧУЖЕРОДНОГО ГЕНА

Хотя экспрессию целевых генов можно контролировать и количественно определять на нескольких уровнях с помощью гель-электрофореза, высокоэффективной жидкостной хроматографии, физико-химического, иммунологического, функционального анализа и др., результаты не всегда верно отражают количественную оценку процесса, т.к. могут варьировать от лаборатории к лаборатории и от одной методики к другой. Наиболее воспроизводимый подход – анализ транскриптома, измерение транскрипционной активности гена с помощью определения количества его мРНК, хотя этот метод не учитывает особенности трансляции и посттрансляционных модификаций, необходимых для завершения синтеза функционального белка [375-380]. Стабилизация мРНК обеспечивает основную точку контроля экспрессии генов практически во всех организмах [381-386].

Информация о ферментах и других факторах, участвующих в процессе деградации мРНК, еще очень ограничена, но 3',5'-экзонуклеазы, РНКазы II и полинуклеотидфосфорилаза, по-видимому, несут основную ответственность за разрушение мРНК [387, 388].

Вторичные структуры на 5'- и 3' концах мРНК [389-392], специфические последовательности на 5'- или 3'-концах ДНК, реагирующие на трансдействующие эффекторы, детерминанты стабильности конкретных генов, скорость роста клеток [393, 394], посттранскрипционные модификации предшественников мРНК и другие факторы влияют на стабильность мРНК и, следовательно, синтез целевого белка [395-405].

Модификация 5'UTR гена L-аспарагиназы из *R. miehei* в pET-28a увеличивала уровень его экспрессии в *B. subtilis* 168 [30].

Изменение первичной структуры мРНК без возможного нарушения ее вторичной структуры и функциональных свойств представляется сложной задачей. Поэтому проблема внутриклеточной стабильности рекомбинантных РНК иногда решается при использовании штаммов-хозяев дефицитных по специфическим РНКазам. В таких клетках повышается стабильность транскриптов рекомбинантных генов, а пониженный внутриклеточный уровень определенных РНКаз способствует более эффективной очистке рекомбинантных белков, так как для них даже незначительные примеси нуклеазной активности бывают нежелательны.

Известны мутанты *E. coli* по генам полинуклеотидфосфорилазы, в которых время полужизни

мРНК чужеродных белков увеличивается в 1.5 раза. Но общеприменимой стратегии предотвращения деградации широкого спектра мРНК в *E. coli* с различным содержанием РНКаз II и РНКаз не существует [387, 406].

6. ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ ДЕГРАДАЦИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ L-АСПАРАГИНАЗ

Многие гетерологичные белки (в нашем случае - L-аспарагиназы) воспринимаются протеолитической системой клетки как аномальные и поэтому подвергаются быстрому расщеплению, что создает множество проблем при их синтезе [58, 407-410].

Эта избирательная деградация подразумевает, что «хозяйские» белки имеют определенные структурные и конформационные особенности, предотвращающие их быстрый оборот. Протеолиз рекомбинантных белков в *E. coli* и его минимизация подробно рассмотрены в работах [411-415].

6.1. Структурные особенности, влияющие на протеолиз гетерологичных белков

Замечено влияние аминоконцевых аргинина, лизина, гистидина, лейцина, фенилаланина, тирозина, триптофана, глутаминовой и аспарагиновой кислот на стабильность белков [416-420]. Приводятся доказательства того, что PEST-области (полипептидные последовательности, обогащенные пролином (P), глутаминовой кислотой (E), серином (S) и треонином (T)) служат протеолитическими сигналами для быстрого разрушения белков [421]. Изменение гидрофобных остатков белка может быть использовано в качестве инструмента для повышения протеолитической стабильности [422].

Белки могут сворачиваться в биологически активные структуры и проявлять повышенную устойчивость к протеолитической деградации, если они снабжены большими фланкирующими гетерологичными белковыми доменами, которые впоследствии могут быть удалены сайт-специфическим расщеплением, например, пептидазой клостридий (клострипаином), специфической сериновой протеиназой (протеаза фактора Ха) и др. [423-432].

His-SUMO метка стабилизировала экспрессию L-аспарагиназы из *E. chrysanthemi* в векторе His6-SUMO-pET14b в *E. coli*. N-концевую метку His6 удаляли во время очистки, а метка SUMO мало влияла на ферментативную активность мутантов, но способствовала более длительной циркуляции *in vivo* [66, 67]. Терапия ферментом SUMO-EgA-WT (50 ME/сут в течение 12 дней) привела к значительному снижению опухолевой нагрузки у ксенотрансплантированных мышей LOUCY [114].

Однако наличие His-метки может отрицательно влиять на тетрамерную конформацию L-аспарагиназы и приводить к снижению ее экспрессии [161, 301]. Слияние генов можно использовать не только для защиты от протеаз, направленной локализации генных продуктов и их эффективной очистки, но и для создания бифункциональных белков, обладающих активностью каждого из двух генных продуктов [433].

Нестабильность *in vivo* L-аспарагиназ из *E. coli* и *E. chrysanthemi*, используемых в настоящее время в клиниках, их короткий период полураспада связывают с чувствительностью к протеазам (катепсину В и

аспарагинэндопептидазе), которые сверхэкспрессируются резистентными лейкозными лимфообластами. Мутация в сайте N24 L-аспарагиназы II из *E. coli* сохраняла аспарагиназную и глутаминазную активности этого фермента, стабильность при длительном хранении, улучшала термические параметры и придавала устойчивость к протеазам лейкозных клеток [94, 434].

6.2. Продуценты с дефицитом протеаз

Штаммы *E. coli* с дефицитом периплазматической протеазы III были сконструированы путем инсерционной инактивации соответствующего гена *prt* [413]. Мутации в генах протеаз DegP *ompT*, *groH*, сигма-факторе РНК-полимеразы, ответственном за синтез белков теплового шока, приводили к увеличению экспрессии и стабильности слитых генов. Однако, эти модификации сопровождаются снижением скорости роста продуцентов [435-437]. В *E. coli* DegP и его гомологи проявляют также молекулярную шаперонную активность в дополнение к своей протеазной функции [438, 439].

Штаммы *P. pastoris* с дефицитом протеаз SMD1163 (*his4 prb1*), SMD1165 (*his4 pep4*), SMD1168 (*his4 pep4*), BG21 предотвращают деградацию рекомбинантного белка, но также демонстрируют медленные темпы роста клеток и низкую эффективность трансформации [440].

Возможно использование штаммов *Str. lividans* и др. с ограниченной активностью протеаз [252, 441].

Для производства L-аспарагиназ популярны модифицированные продуценты, в которых отсутствуют цитоплазматическая протеаза Lon и протеаза внешней мембраны *ompT*, способная повреждать эндогенные рекомбинантные белки после лизиса клеток, например, *E. coli* BL21(DE3) и др. [361, 442].

L-аспарагиназа *E. coli* (активность 2.5 ME/мл) была экспрессирована в системе PichiaPink™, дефицитной по протеазам *pep4* и *prb1* [161]. Coleman и Bruck [443] предложили способы получения рекомбинантной L-аспарагиназы II из *E. chrysanthemi* в вариантах *Pseudomonas fluorescens*, дефицитных по протеазам HslUV, PrtB, Prc, DegP, AprA, Lon, La, Deg P1 и др.

Поскольку создать организм, лишенный протеаз, вряд ли удастся, то для сохранения уже синтезированного белка можно использовать коэкспрессию с генами ингибиторов протеаз, например, геном *pin* бактериофага T4 [40, 444, 445] и оптимизацию условий ферментации [410, 414, 446].

6.3. Локализация синтезируемых белков влияет на их стабильность и функциональную активность

Цитозоль – не лучшее место накопления рекомбинантных белков не только из-за большого числа протеаз [447, 448]. Восстановительные свойства цитозоля не позволяют белкам, богатым цистеинами, образовывать дисульфидные связи, необходимые для правильной конформации [148, 449-451].

Однако эффективная цитоплазматическая экспрессия все еще возможна благодаря модифицированным штаммам *E. coli* с окислительной цитоплазматической средой, способствующей образованию правильных дисульфидных связей [170].

Соответствующий окислительно-восстановительный потенциал поддерживается в периплазме *E. coli*. Считается,

что DsbA (бактериальная тиолдисульфидоксидоредуктаза), растворимый периплазматический белок непосредственно катализирует окисление цистеина и образование дисульфидных связей в белках, а DsbB (белок внутренней мембраны) участвует в повторном окислении DsbA [451–453].

Окислительная среда периплазмы предотвращает агрегацию полипептидных цепей, способствует правильному сворачиванию белков, отщепляет сигнальный пептид при транслокации в периплазму и ведет к получению аутентичного N-конца целевого белка. В отличие от цитозоля, концентрация клеточного белка в периплазме значительно ниже, целевой белок эффективнее концентрируется, и его очистка значительно менее трудоемка.

Протеолитическая активность периплазмы хотя и существенна, но значительно ниже цитоплазматической, и деградация белка в периплазме также менее интенсивна [58, 448, 454–456].

К сожалению, из-за наличия наружной мембраны грамотрицательные бактерии, такие как *E. coli*, обычно выделяют мало белков, и их секреция остается сложным процессом [457–463].

Методологические подходы к секреции белка у *E. coli* удобно разделить на использование существующих путей для “истинно” секретируемых белков, естественных бактериальных экзопротеинов (многие бактериальные токсины, α -амилаза, щелочная, нейтральная и внеклеточные протеазы, левансукраза, киназы, лиазы и нуклеазы) и слияние с N-концевыми аминокислотными последовательностями, называемыми сигнальными, лидерными пептидами [464–472].

Для экспрессии секреторной L-аспарагиназы из *E. chrysanthemi* в *E. coli* были использованы два сигнальных пептида OmpA и DsbA подобранные методами *in silico*. В эксперименте DsbA более эффективно направлял аспарагиназу к клеточной мембране по сравнению с сигнальным пептидом OmpA [473].

Для продукции внеклеточного белка в *E. coli* (DE3) Khushoo и соавт. объединили ген L-аспарагиназы II *E. coli* с лидерной последовательностью *relB* и гистидиновой меткой. После экспрессии и очистки концентрация белка достигала 95 мг/л, что в восемь раз выше ранее опубликованных результатов [290]. Полученный белок был должным образом свернут в активный тетрамер.

Аналогичную систему экспрессии внеклеточной L-аспарагиназы II *E. coli* в *E. coli* BLR (DE3) с лидерной последовательностью *relB* использовали Chan и соавт. [474] для рационального конструирования и получения активных мутантов Q59L L-аспарагиназы.

Перегрузка экспортного механизма может быть результатом неэффективной секреции гетерогенного белка или потому, что уровень его экспрессии превышает возможности клеток.

При этом в цитоплазме *E. coli* накапливаются формы-предшественники чужеродного белка, приводящие к стрессовой реакции, которая, в свою очередь, может повышать активность протеаз и даже привести к гибели клеток. Снижение синтеза чужеродных генов предотвращает перегрузку секреторного аппарата и его блокирование.

Секреции белка также способствует индукция ограниченной проницаемости внешней мембраны [475–

478]. Синергический эффект бактериоцина и глицина на рост клеток, экспрессию и секрецию белка в рекомбинантном штамме RR1 *E. coli* обнаружили Yu. и соавт. [479].

Гибридные белки эффективно секретируются из стрептомицетов (*Streptomyces lividans*) во внешнюю среду при слиянии гетерологичных генов с нуклеотидными последовательностями сигнальных пептидов Sec грамположительных бактерий *Streptomyces spp.* [480, 252]. Грибы *Aspergillus*, используемые в промышленности, также секретируют в среду большое количество белков, связанных с N-концевыми сигнальными последовательностями грибковой секреции [481]. Экспрессия гена L-аспарагиназы из нитчатого гриба *Penicillium sizovae* без периплазматической сигнальной последовательности (первые 20 а.о.) в векторе pPICZaA с α -фактором секреции *S. cerevisiae* в дрожжах *Komagataella phaffii* приводила к накоплению фермента внутри клеток [482].

Использование системы *P. pastoris* и *S. cerevisiae* обеспечивает высокую эффективность экспрессии, фолдинга, ферментацию с высокой плотностью клеток, генетическую стабильность и зрелую систему секреции белков во внешнюю среду с помощью сигнальных последовательностей [156, 483–485].

Ген L-аспарагиназы II *S. cerevisiae* (ScASNaseII), (а.о. 26–362) был слит с сигнальной последовательностью секреции кислой фосфатазы *P. pastoris* и интегрирован в геном штамма *P. pastoris* Glycoswitch®, обладающего клеточным механизмом для экспрессии и секреции большого количества ферментов с гуманизированным гликозилированием. Синтезированная внеклеточная L-аспарагиназа ScASNaseII с удельной активностью 218.2 МЕ /мг была стабильнее на 40% при инкубировании с сывороткой крови человека, чем коммерческая L-аспарагиназа *E. coli* и обладала меньшей перекрестной реактивностью с антителами, выработанными против L-аспарагиназы из *E. coli* и из *E. chrysanthemi* [486].

Сигнальная последовательность (α -MF-фактора *S. cerevisiae*, наряду с его усеченными версиями, была эффективно использована для секреции L-аспарагиназы *E. chrysanthemi* в *P. pastoris* Glycoswitch® SuperMan5 (his-) [301]. Общая активность, в основном, периплазматической L-аспарагиназы при слиянии с His-меткой составила 296.17 МЕ/л.

Наличие сигнальной последовательности необходимо рекомбинантному белку для проникновения в эндоплазматический ретикулум дрожжей, что является начальным этапом секреторной экспрессии.

Ген L-аспарагиназы II из *P. carotovorum* MTCC 1428 с низкой глутаминовой активностью был успешно экспрессирован в *B. subtilis* WB800N [198]. Используемый для трансформации вектор pHT43 включал сигнальный пептид *Bacillus* (amy Q), связанный с последовательностью Шайно-Дальгарно. Это позволило получить периплазматический целевой белок (более 90%) без нативного сигнального пептида. Небольшая часть фермента была прикреплена к мембране (более 6%) и локализована внутри клетки (3%).

Общая стратегия экспрессии гетерологичных белков в грамположительных организмах, таких как *B. subtilis*, предусматривает совместимость целевого белка с секреторным аппаратом хозяина. В зрелом белке присутствующие на N-конце рекомбинантного белка

специфические сигнальные пептиды в *B. subtilis* должны быть удалены пептидазой [191].

В обход классических путей секреции ген L-аспарагиназы I из *B. licheniformis* Z-1 (BIAase) был клонирован, экспрессирован, а его продукт эффективно секретирован *B. subtilis* RIK 1285 без каких-либо N-концевых сигнальных пептидов, хотя обе N- и C-концевые области белка важны для его экспрессии и секреции. При использовании BIAase в качестве сигнального пептида два из пяти белков (grpE и prsA из *B. subtilis* 168) были успешно получены внеклеточно, тогда как слияние с GroES, Blz и BmA приводило к образованию телец включения или отсутствию экспрессии [193].

Feng и соавт. [199] показали, что из восьми сигнальных пептидов (ASN, ywbN, yvgO, amyE, oppA, vpr, lipA и warA) наибольшую экспрессию секретируемого гена L-аспарагиназы II из *B. subtilis* 168 в *B. subtilis* WB600 с использованием промотора HpaII обеспечивал warA (28.91 МЕ/мл). В аналогичной работе [487] с тремя сигнальными пептидами amyE, lipA и warA самую высокую экспрессию в *B. subtilis* WB600 L-аспарагиназы из *Bacillus cereus* в векторе pP43NMK получили с использованием сигнального пептида amyE.

Система меток, состоящая из сигнального пептида pelB и повторяющихся остатков аспартата, применялась для внеклеточной продукции в *E. coli* изофермента аспарагиназы II из *E. coli* [488]. Снижение продукции внеклеточного изофермента при делеции гена gspDE указывает на общий механизм секреции и применимость общей системы меток для накопления внеклеточных рекомбинантных белков.

Векторы секреции прокариотических и эукариотических белков основаны на последовательностях генов секретируемых белков (α -амилазы, щелочной протеазы, нейтральной протеазы, левансуказы и др.). Векторы серии pRIT20 (pRIT21, 22 и 23) включают сигнальную последовательность *Staphylococcal* protein A (SPA) и могут реплицироваться в *E. coli* и *S. aureus*. При этом слитые белки секретируются через цитоплазматическую мембрану любого хозяина. У грамположительного *S. aureus* белок будет локализован внеклеточно. В *E. coli* экспрессия SPA-слитых белков этими векторами приведет к перемещению белка в периплазматическое пространство.

Экспорт рекомбинантного белка в периплазму или внеклеточное пространство с использованием векторов секреции pNIC-BASY (слияние OsmY), pNIC28-DsbA1 (слияние DsbA) и pNIC28-pelB1 (секреция pelB с использованием вектора pNIC28-DsbA1) помогает избежать проблемы неправильного образования дисульфидных связей и снижения растворимости.

6.4. Корректный фолдинг, защита от протеолиза, повышение растворимости рекомбинантных L-аспарагиназ

Корректный фолдинг, защита от протеолиза, повышение растворимости и стабилизация – сопутствующие свойства гетерогенного белка при использовании слитых пептидов в системе экспрессии [285, 429, 489-496].

Слияние мутантного варианта L-аспарагиназы *E. chrysanthemi* со сниженной L-глутаминазной активностью при сохранении L-аспарагиназной активности (ErA-TM) с альбуминсвязывающим доменом (ABD) значительно увеличивало его персистенцию *in vivo* и уменьшало

количество острых побочных эффектов, связанных с ко-глутаминазной активностью [497].

Рекомбинантная L-аспарагиназа, связанная с белком 30Kc19 через линкерную последовательность PLGLAG (LK), обладала повышенной стабильностью и способностью проникать в клетки благодаря присутствию в белке домена, проникающего в клетки пептида (CPP). Повышенную противоопухолевую эффективность можно объяснить внутриклеточной доставкой как нерасщепленной, так и расщепленной форм белка, допуская, что L-аспарагиназа эффективно истощала Asp не только снаружи, но и внутри клетки [498].

Guo и соавт. [499] клонировали в плазмиде pET-SLA генетическую конструкцию, кодирующую слитый белок, состоящий из L-аспарагиназы *E. coli* и защитного одноцепочечного белка Fv (scFv), выбранного из библиотеки scFv для фагового дисплея. Линкерный пептид (Gly(4)Ser)(6) использовали для присоединения фрагмента антитела к слитому белку (к N-концу фрагмента фермента). Экспрессируемый продукт в *E. coli* образовывал тельца включения. После повторного сворачивания и очистки полученный растворимый слитый белок обладал приблизительно 82% ферментативной активности нативной L-аспарагиназы при той же молярной концентрации. Слитый белок был более устойчив к протеолизу трипсином, альфа-химотрипсином и сычужным ферментом, чем нативная L-аспарагиназа. Слитый фермент scFv-ASNase имел гораздо более длительный период полураспада *in vitro* (9 ч) в сыворотке крови, чем нативный фермент (2 ч).

Разработанные Koken и соавт. [432] векторы экспрессии pETUBI-ES для производства белков в *E. coli* позволяют клонировать любую последовательность в рамке считывания с геном убиквитина, управляемым сильным промотором T7f10. Большое количество стабильной РНК продуцируется РНК-полимеразой T7, а слияние убиквитина с N-концом белков-мишеней, по-видимому, обеспечивает более эффективную трансляцию, лучший фолдинг и защиту от протеолитической дегградации. Часть убиквитина может быть использована для очистки целевого белка, после чего он может быть легко удален из продукта слияния убиквитинспецифическими протеазами.

Использование системы pET14b-SUMO и системы скрининга на основе флуоресцентно-активированной сортировки клеток значительно повысило каталитическую эффективность человеческой L-аспарагиназы hASNase-3 [80, 81, 103]. Caetano [489] также успешно использовал систему pET-SUMO для экспрессии мутантной L-аспарагиназы из *E. coli* в *E. coli*. Слияние генов с последовательностью убиквитина увеличило выход гетерологичных белков с неопределяемого до 20% от общего количества клеточного белка в *E. coli* [490, 500].

Для ко-трансляционного расщепления сконструированных белков-гибридов с убиквитином, экспрессируемых в *E. coli*, было предложено [491] использовать совместно экспрессируемую в *E. coli* убиквитинспецифическую протеазу Ubp2 *S. cerevisiae*.

SUMO в составе с белком L6 KD-SUMO повышал синтез биологически активной L-аспарагиназы из *Wolinella succinogenes* в *E. coli*, при этом вся активность ассоциировалась с осадочной фракцией [501]. Другие слитые белки (сигнальные пептиды, аффинные метки и др.) часто используются для повышения эффективности

экспрессии и растворимости целевых генов (L-аспарагиназ) [182, 199, 212, 301, 502-504].

В некоторых случаях образование нерастворимых агрегатов L-аспарагиназы в *E. coli* увеличивается при повышении гидрофобности сигнальных пептидов [505].

Шапероны, а так же фолдазы и изомеразы (известные как «модуляторы сворачивания») способствуют правильному формированию окончательной структуры белков, их стабилизации и растворимости [59, 494, 506-511].

Две основные группы модуляторов свертывания белков (молекулярных шаперонов) в цитоплазме *E. coli* Hsp70 и Hsp60 были дополнены GroEL и GroES [512-515]. но белки семейства Hsp70 связаны с тепловым шоком у *E. coli* и их производство должно быть сбалансировано.

Присутствие GroELs и TF шаперонов, экспрессируемых плазмидой PG-Tf2, увеличивало количество растворимого модифицированного белка Q59L L-аспарагиназы из *E. coli* как в SHuffle T7, так и в *E. coli* BL21 (DE3) [516]. Но эффективность синтеза растворимого фермента в штамме SHuffle T7 была значительно выше, чем в *E. coli* BL21 (DE3), что можно объяснить продукцией штаммом SHuffle T7 хромосомной копии изомеразы дисульфидных связей DsbC и trxB gor генотипом, определяющим окислительные свойства среды, правильное сворачивание L-аспарагиназ и предотвращение образование нерастворимых агрегатов [517].

Совместная экспрессия отдельных шаперонов – распространенная стратегия повышения качества и растворимости рекомбинантов [285, 518-522]. Шаперонины Cpn10 и Cpn60 О штамма *E. coli* ArcticExpress (DE3) повышали удельную активность и растворимость цитозольной L-аспарагиназы II *E. coli* [187].

Три набора плазмид, включающих шапероны GroEL-GroES (GroELS), DnaK-DnaJ-GrpE (DnaKJE) и триггерный фактор (TF), были коэкспрессированы в *E. coli* BL21 (DE3) попарно с двумя векторами pET22, несущими рекомбинантные гены гирудина-РА (Hir) и различные сигнальные последовательности щелочной фосфатазы и L-аспарагиназы II [523]. Сверхэкспрессия цитоплазматических комбинаций молекулярных шаперонов, содержащих GroELS и DnaKJE, с PhoAHir увеличивала секреторную продукцию PhoAHir в 2.6 и в 3.5 раза по сравнению с контролем соответственно. Экспрессия периплазматической L-аспарагиназы была значительно увеличена только в присутствии DnaKJE.

Различные типы белков слияния могут действовать согласованно [59, 522, 524]. SecD и SecE – трансмембранные белки с расширенными периплазматическими доменами – могут предотвращать агрегацию вновь перемещенных белков на начальных стадиях сворачивания.

Протеиндисульфидизомеразу (PDI) человека с фьюжн-белком (OmpA-PDI) экспрессировали в периплазме *E. coli* [524]. PDI увеличивала выход активной пектацтиазы С и способна функционально заменять DsbA при сворачивании белков с дисульфидными связями в бактериальной периплазме [525].

Результаты влияния молекулярных шаперонов на экспрессию генов иногда противоречивы, и, по-видимому, зависят от конкретных компонентов системы; поэтому не следует ожидать общего эффекта от избыточной продукции любого из шаперонов на сворачивание всех гетерологичных белков [495, 526, 527]. Кроме того, сверхэкспрессия

шаперонов может привести к формированию клеточных филаментов и отрицательно сказаться на жизнеспособности продуцента [520].

Совместная экспрессия гена, кодирующего Pcal_0970 (L-аспарагиназа растительного типа из гипертермофильного архея *P. calidifontis*) с молекулярным шапероном GroEL из *Geobacillus thermopakistanensis*, привела к образованию растворимой, но термолabileйной рекомбинантной Pcal_0970. Нерастворимый и неактивный белок, повторно свернутый *in vitro* с помощью фракционного диализа Pcal_0970, проявлял активность в течение 48 ч автоклавирования при 80°C [224].

Последовательность L-аспарагиназы *P. furiosus* (PfA) не похожа на α -кристаллин или какой-либо другой известный молекулярный шаперон, но поведение N-концевого домена (22 кДа) L-аспарагиназы *P. furiosus* (NPfA) позволяет рассматривать его как новый молекулярный неканонический шаперон [72]. Независимо экспрессирующийся NPfA самопроизвольно сворачивается, тогда как CPfA домен образует нерастворимые агрегаты. Однако при смешивании и повторном сворачивании NPfA восстанавливал сворачивание CPfA. NPfA функционально похож на малые белки теплового шока (SHSP) и защищает различные белки-субстраты от опосредованной рефолдингом термической агрегации. Jena и соавт. [528] подтвердили, что гетерологичная экспрессия N-концевого домена гипертермофильной L-аспарагиназы (NPfA) позволила клеткам *E. coli* расти при 52°C и пережить тепловой шок при температуре до 62°C. Предполагается прямое белок-белковое взаимодействие, имеющее, видимо, гидрофобную природу.

6.5. Тельца включения

Склонность к агрегации при избыточной экспрессии гетерологичных белков или неправильном образовании дисульфидных связей ограничивает их производство в *E. coli*. Но точные физико-химические параметры, способствующие образованию телец включения, остаются неясными [529-535].

Образование телец включения нередко наблюдается и при экспрессии генов рекомбинантных L-аспарагиназ. Например, L-аспарагиназа II *S. cerevisiae*, продуцируется в *E. coli* в основном в нерастворимой и неактивной форме [27]. Экспрессируемый в плазмиде pET-SLA продукт гена L-аспарагиназы из *E. coli* и защитного белка Fv (scFv) в *E. coli* также образовывал тельца включения [499].

Для улучшения растворимости и сворачивания гетерогенных белков используют: (1) специализированные продуценты (например, с дефицитом тиоредоксинредуктазы) [170, 534, 535]; (2) изменение первичной последовательности гена [536, 537]; (3) коэкспрессию с шаперонами [515, 520, 522, 538] и другими вспомогательными протеинами (например, тиоредоксином *E. coli*) либо в качестве партнера по слиянию совместно с представляющим интерес белком [493, 496, 527]; (4) выращивание бактериальных культур при пониженных температурах [531, 532, 539, 540]; (5) рост и индукцию клеток в условиях осмотического стресса в присутствии сорбитола и глицилбетаина [541]; (6) добавление неметаболизируемых сахаров в питательную среду [542]; (7) изменение pH питательной среды [543] и др.

Иногда агрегированные белки, обладающие структурой и функциональной активностью, удается выделить из

бактериальных клеток гомогенизацией, ферментативным лизисом или обработкой ультразвуком [544-547]. Но обычно восстановление активного белка в нативной конформации из нерастворимых белковых агрегатов остается сложной задачей [57, 83, 530, 548-555]. Однако, агрегирование белков может быть и преимуществом, так как такие белки резистентны к протеолизу, легко концентрируются центрифугированием, минимально загрязнены другими белками и при определенных условиях способны к рефолдингу в активные, растворимые формы [535, 556, 557].

Слитый ген L-аспарагиназы из *E. coli* и защитного белка Fv (scFv) при экспрессии в *E. coli* образовывал тельца включения, но был более стабильным, чем нативная L-аспарагиназа [499]. 82% ферментативной активности нативной L-аспарагиназы при той же молярной концентрации проявлялось после повторного сворачивания и очистки.

Рекомбинантная L-аспарагиназа *Pyrobaculum calidifontis* 0970 была получена в клетках *E. coli* в нерастворимой и неактивной форме, которую растворили и преобразовали в ферментативно активную форму (K_m 4.5 ± 0.4 ммоль/л для L-аспарагина) [190].

Изучение активности в тельцах включения на модели L-аспарагиназы II *E. coli* свидетельствовало о существовании правильно свернутых тетрамерах фермента. Интересно, что даже при низких температурах индукции (20°C и 30°C) аспарагиназа агрегировала в тельца включения, демонстрируя более высокое содержание амилоида и склонность белка к агрегации. Тельца включения, образовавшиеся при повышенной температуре (42°C), были наиболее активными [554].

В работе Upadhyay и соавт. [57] L-аспарагиназа II *E. coli* была экспрессирована в клетках *E. coli* в виде нерастворимых агрегатов и использована в качестве модельной системы для рефолдинга в биоактивную тетрамерную форму.

6.6. Аффинные метки

Аффинные метки (affinity tags) олиго- или полипептидные последовательности, обладающие высоким сродством к определенному лиганду, используют для упрощения процедуры очистки, а также повышения растворимости и стабилизации рекомбинантного белка [352, 428, 558]. По природе лиганды аффинных меток могут быть ионами металлов, углеводами, низкомолекулярными органическими веществами, субстратами ферментов, другими белками или пептидами. Специфический лиганд обычно иммобилизуется на хроматографическом сорбенте, позволяя проводить высокоспецифическую очистку при помощи аффинной хроматографии. Бактериальные рецепторы-сывороточные белки (стафилококковый белок A-Fc и стрептококковый белок G- сывороточный альбумин); стрептавидин-биотин с различными условиями связывания, элюирования облегчают получение, обнаружение и очистку рекомбинантных белков. Для быстрой и эффективной очистки белка, в том числе L-аспарагиназ, также используются аффинные метки: Strep-метка II или Poly-His, FLAG, poly-Arg, c-Myc и S-tag и др. [66, 67, 114, 301, 305 и др.].

В исследовании Darwesh и соавт. [212] ген *B. pseudomallei* L-аспарагиназы в рамке с геном глутатион-S-трансферазы был клонирован в плазмиде pGEX-2T, экспрессирован в *E. coli* BL21 (DE3) pLysS; целевой белок был очищен до гомогенности с помощью хроматографии

на глутатион-сефарозе, кратность очистки составила 7.26, а извлечение 16.01%, первоначальная активность фермента при 30°C была сохранена на 95.1%.

Вектор pET22 с 6-His-tag облегчал очистку L-аспарагиназы из *E. carotovora*, клонированной и экспрессированной в *E. coli* BL21 (DE3) [175]. Активная L-аспарагиназа *Z. mobilis* с гистидиновой меткой и сигнальным пептидом была экспрессирована в *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/ans в гораздо больших количествах, чем L-аспарагиназа исходного микроорганизма [361]. Успешная сверхэкспрессия полноразмерной кодирующей последовательности L-аспарагиназы из *P. aeruginosa* с 6-His- меткой в векторе pET28a(+) была достигнута в *E. coli* DE3(BL21) pLysS. Активный фермент был 10.28-кратно очищен с использованием металл-хелатной хроматографии на Ni²⁺-сефарозе (удельная активность 19758.8 ME/мг) [213]. Ген *S. cerevisiae*, кодирующий L-аспарагиназу II с гистидиновой меткой в векторе pET28, был экспрессирован в *E. coli* BL21 (DE3). Целевой белок был получен в виде внутриклеточной растворимой формы (225.6 ME/r) и очищен с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии. Фермент обладал относительно низкой L-глутаминазной активностью и проявлял противоопухолевое действие в отношении клеточных линий K562 и Jurkat, сопоставимое с действием коммерческой L-аспарагиназы из *E. coli* [105].

Одноэтапная очистка внеклеточной рекомбинантной L-аспарагиназы из *E. coli* с N-концевой гистидиновой меткой с помощью Ni-NTA аффинной хроматографии привела к общему выходу очищенного белка 95 мг/л, что примерно в восемь раз выше ранее опубликованных результатов [290].

Гены, кодирующие L-аспарагиназы I и II типа *S. cerevisiae*, были клонированы в *E. coli* [27]. Белок II типа всегда продуцировался в нерастворимой и неактивной форме, а растворимая часть белкового экстракта I типа с гистидиновой меткой после аффинной хроматографии на системе быстрой жидкостной хроматографии белков (FPLC) с использованием Ni²⁺-заряженной аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металлов (IMAC) HiTrap FF показала высокую удельную активность (110.1 ± 03 ME /мг).

Концепция двойного аффинного слияния, разработанная Hammarberg и соавт. [423], при которой целевой ген встроен между двумя гетерологичными доменами со специфическим сродством к двум разным лигандам, позволяет выделять полноразмерный белок на двух аффинных колонках.

Sannikova и соавт. [126] использовали N-концевой гепаринсвязывающий пептид (KRKKKKKGKGLGKKKKR), ответственный за связывание с гепарином и опухолевыми клетками K562 *in vitro* для экспрессии в *E. coli* BL21(DE3) L-аспарагиназы из *Wolinella succinogenes* с двумя аминокислотными заменами (V23Q и K24T), обеспечивающими устойчивость к трипсину. Присутствие пептида привело к улучшению активности фермента и повышению его терапевтической эффективности при тестировании на мышинной модели лимфаденоза Фишера L5178Y.

7. ФЕРМЕНТАЦИЯ

Непрерывная экспрессия чужеродного гена может оказаться неэффективной и губительной для клетки-хозяина из-за метаболической перегрузки. Для оптимизации экспрессии удобно использовать регулируемые сильные

промоторы, тогда в первой фазе ферментации (обычно до середины логарифмической фазы роста) при минимальной активности промотора идет накопление биомассы, а синтеза чужеродных генов нет. На втором этапе при замедлении роста, под влиянием соответствующего индуктора и дерепрессии промотора, большая часть ресурсов клетки используется для синтеза целевого белка. При максимальном увеличении плотности культуры на долю продукта может приходиться более 5% суммарного клеточного белка, что отражено в подробных обзорах крупномасштабных систем ферментации *E. coli* [446, 559–561].

Твердофазное производство ферментов весьма эффективно, но масштабирование этой технологии ограничено. Большинство коммерческих ферментов, в том числе L-аспарагиназ, получают в жидкой питательной среде (SmF) [194, 562] в условиях культивирования, учитывающих высокую плотность клеток, снижение эффективности перемешивания в ферментере, выделение тепла, ограничение доступности растворенного кислорода, повышение уровня углекислого газа и возможное образование ацетата [446, 563].

На производство L-аспарагиназ оказывают влияние не только структурные особенности и свойства экспрессионной системы продуцента и целевого белка [33, 132, 168, 564, 565], но и такие параметры культивирования, как состав питательной среды, температура, pH, объем инокулята, скорость перемешивания, аэрация, время инкубации и др. [3, 566–568].

Состав среды может оказывать значительное метаболическое воздействие на клетки и должен быть тщательно подобран и контролироваться [414, 569].

Оптимизация синтеза рекомбинантной L-аспарагиназы II из *E. coli* в штамме *E. coli* BL 21 (DE3) в шейкере и биореакторе в различных питательных средах привела к 23-кратному увеличению концентрации клеток и выхода фермента [570].

Максимальная активность внеклеточной L-аспарагиназы II *E. coli* с собственной сигнальной последовательностью, наработанной в *E. coli* BL21 (DE3) в оптимизированной среде LB, в колбе составила 17386 Ед/л, что всего на 1.7% отличалось от прогнозируемого значения модели RSM [571].

Среда EnPresso В может обеспечить более высокие выходы рекомбинантных белков на объем культуры по сравнению с LB и другими традиционными питательными средами. Регулировка доставки глюкозы методом EnBase при культивировании в биореакторе и в шейкере обеспечивает высокие выходы биомассы и рекомбинантного белка. Ферментативная доставка глюкозы имитирует принцип дозирования, используемый при культивировании в биореакторах [572].

При синтезе L-аспарагиназы из *Bacillus sp.* с использованием метода SmF во вращающемся шейкере выяснилось, что использование глюкозы в качестве источника углерода было эффективнее, чем мальтозы [573]. Однако, высокая концентрация глюкозы в среде в качестве источника углерода подавляла выработку фермента грибами *Fusarium sp.* [574].

Активация спящего гена *kil* и в плазмиде pMB9 и присутствие глицина усиливает проницаемость мембраны и выход периплазматических белков в среду, не вызывая значительного лизиса клеток [478, 575], а рост клеток в

условиях осмотического стресса в присутствии сорбита и глицилбетаина вызывает более чем 400-кратное увеличение выработки растворимого активного белка [541].

Большинство исследователей сообщили об оптимальных температурах синтеза 25–37°C и pH 7.0–7.5 различных L-аспарагиназ в бактериях [45, 213, 576–578] (и др.).

de Moura и соавт. [187] синтезировали L-аспарагиназу из *E. coli* в одиннадцати различных штаммах *E. coli* при 16°C. Правильно свернутый тетрамерный фермент был получен с использованием штамма ArcticExpress (DE3), совместно экспрессирующего шаперонины, в то время как все другие штаммы продуцировали плохо свернутые белки.

Сверхэкспрессия рекомбинантных белков под контролем Lac- промотора и его аналогов достигалась с помощью индукции изопропил-b-D-1-тиогаляктопиранозидом (IPTG) в концентрации от 0.1 mM [577, 579] до 10 mM [580].

Vagtos и соавт. [570] в экспериментах, проводимых в биореакторе, в качестве индуктора использовали не IPTG, а лактозу из-за ее более низкой стоимости и меньшей токсичности, что обеспечило получение сопоставимой активности белка 43954.79 ME/л.

Использование методов статистического моделирования Plackett-Burman, OVAT(OFAT), RSM и др. и определение влияния параметров культивирования на продукцию гетерологичных L-аспарагиназ различными микроорганизмами позволяет значительно повысить выход целевого белка [185, 198, 568, 579, 580–583] (и др.).

Методы машинного обучения, такие как искусственные нейронные сети (ANN), генетические алгоритмы (GA), методы статистического моделирования Plackett-Burman, OVAT(OFAT), RSM и др. могут оказаться полезными при оптимизации условий культивирования различных продуцентов гетерологичных L-аспарагиназ и позволят значительно повысить выход целевого белка [185, 198, 568, 579, 580–583].

Для производства L-аспарагиназы *Enterobacter aerogenes* методом SmF содержание компонентов ферментационной среды было подобрано с использованием генетического алгоритма на основе ANN и достигнута экспериментальная активность 18.72 ME/мл [581].

Эффективность синтеза гликозилированной L-аспарагиназы *Dickeya chrysanthemi* сравнивали в прототрофных и ауксотрофном по отношению к гистидину штаммах *P. pastoris* WT и Glycoswitch® SuperMan5 при использовании сложной среды в колбах и синтетической среды в биореакторе. Прототрофный штамм показал более высокую продуктивность, чем ауксотрофный. Из двух стратегий индукции прототрофного штамма (импульсы метанола и DO-стат) последняя привела к увеличению максимальной объемной активности в 2 раза [157].

Для получения L-аспарагиназы II из *S. cerevisiae* в *P. pastoris* (16,2 ME/г) оптимальной была периодическая подача глицерина, температура 20°C, концентрация метанола 3% (v/v), доступность кислорода и время индукции 48 ч [155].

Оптимальные условия экспрессии и добавления углеродных и энергетических субстратов зависят от того, продуцируются ли рекомбинантные белки под контролем индуцируемого промотора AOX1 или конститутивного промотора GAP в штаммах Mut⁺ или MutS *P. pastoris*. Стандартные протоколы культивирования и экспрессии описаны в коммерческих наборах Invitrogen [3, 14, 584, 585].

8. ХИМИЧЕСКАЯ СТАБИЛИЗАЦИЯ СИНТЕЗИРОВАННЫХ L-АСПАРАГИНАЗ

Химическая модификация конечного очищенного продукта экспрессированного гена в некоторых случаях может способствовать его сохранению и усилению полезных свойств (слияние с scFv, доменами TRAIL, альбумином, пегилирование, PASилирование, биоконъюгация и др.) [2, 499, 586-588].

Химическая модификация коммерческой биоаналоговой *E. coli* L-аспарагиназы (Leunase® («Kyowa Hakko Kirin», Япония) карбоксиметилдекстраном приводит к конформационным изменениям в белке, повышению его удельной активности и стабильности [589].

Модифицированная N,O-карбоксиметилхитозаном L-аспарагиназа *E. coli* сохраняла высокую каталитическую активность, демонстрировала большую устойчивость в отношении трипсина и альфа-химотрипсина, чем нативный фермент. Период полураспада модифицированного фермента в плазме крови ($t_{1/2} = 40$ ч) был выше в 33 раза, чем у нативного фермента ($t_{1/2} = 1.6$ ч) [590].

ПЭГилирование обеспечивает стабильную конформацию как нативного белка, так и аспарагин-белкового комплекса, повышает термическую и pH стабильность, увеличивает период полураспада в сыворотке крови, устойчивость к протеазам по сравнению с нативным ферментом [591].

Сохранение тетрамерной структуры ПЭГилированной L-аспарагиназы *E. coli* подтвердили Cerofolini и соавт. [592]. Однако такая модификация может приводить к снижению биологической активности конъюгатов по сравнению с нативным ферментом [593].

Онкаспар® представляет собой версию Элспара®, полученную путем ковалентной конъюгации L-аспарагиназы *E. coli* с монометоксиполиэтиленгликолем (ПЭГ), что увеличило стабильность, период полувыведения из плазмы и снижение иммуногенности и антигенности фермента. Однако наблюдались побочные эффекты [594].

Стабилизирующий эффект сопровождал образование полиэлектролитных комплексов L-аспарагиназ *E. chrysanthemi* и *R. rubrum* с хитозаном и его сополимерами. Влияние хитозана на стабилизацию L-аспарагиназы *E. chrysanthemi* при нагревании было сильнее, чем у L-аспарагиназы *R. rubrum*. Комплексообразование L-аспарагиназы *R. rubrum* с полиэтиленгликолем снизило константу термической инактивации в 2.2 раза, а константу инактивации при трипсинолизе в два раза по сравнению с нативным ферментом. Комплексообразование хитозан-ПЭГ позволило сохранить или даже повысить высокий уровень каталитической активности ферментов с одновременным повышением их термостабильности [595].

AlphaFold2 предсказал структуру L-аспарагиназы, связанной с эластиноподобным полипептидом (ELP). Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что по сравнению с нативной L-аспарагиназой и ПЭГ-аспарагиназой, L-ASNase-ELP обладала более высокой стабильностью, более длительным периодом полураспада, меньшей иммуногенностью, меньшей токсичностью и более высокой активностью *in vivo* и *in vitro* [89].

Для клинического применения модифицированная L-аспарагиназа может оказаться более полезной, чем нативный фермент.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Универсальной стратегии оптимизации экспрессии клонированных генов, в том числе и L-аспарагиназ, не существует из-за уникального строения генов, целевых белков и множества параметров, влияющих на производственный процесс. Оптимальные условия синтеза с учетом большого количества взаимосвязанных факторов (выбор и модификация продуцента, вектора, стабильность гена и его продукта, оптимизация кодонов, введение искусственных сайтов гликозилирования или сигнальных пептидов, условия ферментации и др.) в каждом случае приходится подбирать заново.

Внедрение методов биоинформатики, компьютерного дизайна и рационального проектирования позволяет обрабатывать большие объемы статистических данных и выявлять сложные закономерности в различных гетерологичных системах экспрессии L-аспарагиназ и получать наилучший результат, что подробно изложено в обзоре Shishparenok и др. [41]. Так, SignalP и Phobius предсказывают наиболее эффективные сигнальные пептиды для заданной аминокислотной последовательности; алгоритм ndsDSAFBA оптимизирует метаболические пути *in silico*; глубокие нейронные сети, например MPEPE, предсказывают мутации аминокислотной последовательности для улучшения экспрессии белка. Машинное обучение (МО) используют в качестве стратегии рационального проектирования, например, MALLPHAS – инструмента инженерии штаммов, оптимизирующего секрецию белка и др. Компьютерное моделирование белков дополняет и делает более точными и эффективными методы практической биотехнологии.

Направленная генетическая модификация организмов снимает естественные барьеры между отдаленными видами, перестраивает геном и расширяет возможности решения прикладных задач, способствуя изучению функционирования генов и многих фундаментальных эволюционных процессов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы) (№ 122022800499-5).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Loch, J., Jaskolski, M. (2021) Structural and biophysical aspects of L-asparaginases: A growing family with amazing diversity. IUCrJ, 8 (4), 514-

531. DOI: 10.1107/S2052252521006011
2. Brumano, L., da Silva, F.V.S., Costa-Silva, T., Apolinário, A., Santos, J., Kleingesinds, E., Monteiro, G., Rangel-Yagui, C., Benyahia, B., Junior, A. (2019) Development of L-asparaginase biobetters: current research status and review of the desirable quality profiles. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, **10**(6), 212. DOI: 10.3389/fbioe.2018.00212
3. Cachumba, J.J., Antunes, F.A., Peres, G.F., Brumano, L.P., Santos, J.C., Da Silva, S.S. (2016) Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], **47** (Suppl 1), 77-85. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.10.004
4. Eisele, N., Linke, D., Bitzer, K., Na'amnieh, S., Nimtz, M., Berger, R. (2011) The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. *Bioresource technology*, **102**(3), 3316-3321. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.10.098
5. Jha, S. K., Pasrija, D., Sinha, R., Singh, H.R., Nigam, V., Vidyarthi, A. (2012) Microbial L-asparaginase: a review on current scenario and future prospects. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **3**(9), 3076-3090. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.3(9).3076-90
6. Dumina, M., Zhgun, A., Pokrovskaya, M., Aleksandrova, S., Zhdanov, D., Sokolov, N., El'darov, M. (2021) Highly active thermophilic L-asparaginase from *Melioribacter roseus* represents a novel large group of type II bacterial L-asparaginases from chlorobi-ignavibacteriae-bacteroidetes clade. *International journal of molecular sciences*, **22**(24), 13632. DOI: 10.3390/ijms222413632
7. Mahajan, R.V., Kumar, V., Rajendran, V., Saran, S., Ghosh, P.C., Saxena, R.K. (2014) Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-glutaminase activity from *Bacillus licheniformis*: in vitro evaluation of anti-cancerous properties. *PLoS One*, **9**(6):e99037. DOI: 10.1371/journal.pone.0099037
8. Sarquis, M.I., Oliveira, E.M., Santos, A.S., Costa, G.L. (2004) Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **99**(5), 489-492. DOI: 10.1590/s0074-02762004000500005
9. da Cunha, M.C., Dos Santos, Aguilar, J.G., de Melo, R.R., Nagamatsu, S.T., Ali, F., de Castro, R.J.S., Sato, H.H. (2019) Fungal L-asparaginase: Strategies for production and food applications. *Food research international*, **126**, 108658. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108658
10. Saleh, A.A., El-Aref, H.M., Ezzeldin, A.M., Ewida R.M., Bedak, O.A.A.I. (2025) L-asparaginase from the novel *Fusarium falciforme* AUMC 16563: extraction, purification, characterization, and cytotoxic effects on PC-3, HePG-2, HCT-116, and MCF-7 cell lines. *BMC microbiology*, **25**(1), 145. DOI: 10.1186/s12866-025-03833-8
11. Casado, A., Caballero, J.L., Franco, A.R., Cárdenas, J., Grant, M.R., Muñoz-Blanco, J. (1995) Molecular cloning of the gene encoding the L-asparaginase gene of *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology*, **108**(3), 1321-1322. DOI: 10.1104/pp.108.3.1321
12. Sharma, A., Kaushik, V., Goel, M. (2022) Insights into the distribution and functional properties of L-asparaginase in the *Archaeal domain* and characterization of *Picrophilus torridus* asparaginase belonging to the novel family Asp2like1. *ACS Omega*, **7**(45), 40750-40765. DOI: 10.1021/acsomega.2c01127
13. Broome, J.D. (1965) Antilymphoma activity of L-asparaginase in vivo: clearance rates of enzyme preparations from guinea pig serum and yeast in relation to their effect on tumor growth. *Journal of the National Cancer Institute*, **35**(6), 967-974. DOI: 10.1093/JNCI/35.6.967
14. Lopes, A.M., Oliveira-Nascimento, L., Ribeiro, A., Tairum, C.A. Jr., Breyer, C.A., Oliveira, M.A., Monteiro, G., Souza-Motta, C.M., Magalhães, P.O., Avendaño, J.G., Cavaco-Paulo, A.M., Mazzola, P.G., Rangel-Yagui, C.O., Sette, L.D., Converti, A., Pessoa, A. (2017) Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. *Critical reviews in biotechnology*, **37**(1), 82-99. DOI: 10.3109/07388551.2015.1120705
15. Bosmann, H.B., Kessel, D. (1970) Inhibition of glycoprotein synthesis in L5178Y mouse leukaemic cells by L-asparaginase in vitro. *Nature*, **226**(5248), 850-851. DOI: 10.1038/226850a0
16. Bejger, M., Imiolczyk, B., Clavel, D., Gilski, M., Pajak, A., Marsolais, F., Jaskolski, M. (2014) Na⁺/K⁺ exchange switches the catalytic apparatus of potassium-dependent plant L-asparaginase. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **70**(Pt 7), 1854-1872. DOI: 10.1107/S1399004714008700
17. Vimal, A., Kumar, A. (2020) Antimicrobial potency evaluation of free and immobilized L-asparaginase using chitosan nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **61**(6), 102231. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.102231
18. Vimal, A., Kumar, A. (2022) L-asparaginase: Need for an expedition from an enzymatic molecule to antimicrobial drug. *International journal of peptide research and therapeutics*, **28**(1), 9. DOI: 10.1007/s10989-021-10312-x
19. Zielesinski, A., Loch, J.I., Karlowski, W.M., Jaskolski, M. (2022) Massive annotation of bacterial L-asparaginases reveals their puzzling distribution and frequent gene transfer events. *Scientific reports*, **12**(1), 15797. DOI: 10.1038/s41598-022-19689-1
20. Abd El-Baky, H.H., El-Baroty, G.S. (2020) Spirulina maxima L-asparaginase: immobilization, antiviral and antiproliferation activities. *Recent patents on biotechnology*, **14**(2), 154-163. DOI: 10.2174/1872208313666191114151344
21. Vimal, A., Kumar, A. (2018) L-Asparaginase: a feasible therapeutic molecule for multiple diseases. *3 Biotech*, **8**(6), 278. DOI: 10.1007/s13205-018-1282-3
22. Darvishi, F., Jahanafrooz, Z., Mokhtarzadeh, A. (2022) Microbial L-asparaginase as a promising enzyme for treatment of various cancers. *Applied microbiology and biotechnology*, **106**(17), 5335-5347. DOI: 10.1007/s00253-022-12086-8
23. Ściuk, A., Wątor, K., Staroń, I., Worsztynowicz, P., Pokrywka, K., Sliwiak, J., Kilichowska, M., Pietruszewska, K., Mazurek, Z., Skalniak, A., Lewandowski, K., Jaskolski, M., Loch, J.I., Surmiak, M. (2024). Substrate affinity is not crucial for therapeutic L-asparaginases: antileukemic activity of novel bacterial enzymes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **29**(10), 2272. DOI: 10.3390/molecules29102272
24. Wang, N., Ji, W., Wang, L., Wu, W., Zhang, W., Wu, Q., Du, W., Bai, H., Peng, B., Ma, B., Li, L. (2022) Overview of the structure, side effects, and activity assays of L-asparaginase as a therapy drug of acute lymphoblastic leukemia. *RSC medicinal chemistry*, **13**(2), 117-128. DOI: 10.1039/d1md00344e
25. Patel, P., Panseriya, H., Vala, A.K., Dave, B.P., Gosai, H. (2022). Exploring current scenario and developments in the field of microbial L-asparaginase production and applications: A review. *Process Biochemistry*, **121**, 529-541. DOI: 10.1016/j.procbio.2022.07.029
26. Xu, F., Oruna-Concha, M.J., Elmore, J.S. (2016) The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. *Food chemistry*, **210**, 163-171. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.04.105
27. Santos, J.H.P.M., Costa, I.M., Molino, J.V.D., Leite, M.S.M., Pimenta, M.V., Coutinho, J.A.P., Pessoa, A.Jr., Ventura, S.P.M., Lopes, A.M., Monteiro, G. (2017) Heterologous expression and purification of active L-asparaginase I of *Saccharomyces cerevisiae* in *E. coli* host. *Biotechnology progress*, **33**(2), 416-424. DOI: 10.1002/btpr.2410
28. Tekoah, Y., Shulman, A., Kizhner, T., Ruderfer, I., Fux, L., Nataf, Y., Bartfeld, D., Ariel, T., Gingis-Verlitski, S., Hanania, U., Shaaltiel, Y. (2015) Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture: the Protalix experience. *Plant biotechnology journal*, **13**(8), 1199-1208. DOI: 10.1111/pbi.12428
29. Zhu, J. (2012) Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology advances*, **30**(5), 1158-1170. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.022
30. Zhang, X., Wang, Z., Wang, Y., Li, X., Zhu, M., Zhang, H., Xu, M., Yang, T., Rao, Z. (2021) Heterologous expression and rational design of L-asparaginase from *Rhizomucor miehei* to improve thermostability. *Biology*, **10**(12), 1346. DOI: 10.3390/biology10121346
31. Lefin, N., Miranda, J., Beltrán, J.F., Belén, L.H., Effer, B., Pessoa, A. Jr., Farias, J.G., Zamorano, M. (2023) Current state of molecular and metabolic strategies for the improvement of L-asparaginase expression in heterologous systems. *Frontiers in pharmacology*, **14**, 1208277. DOI: 10.3389/fphar.2023.1208277
32. Yang, X., Rao, Y., Zhang, M., Wang, J., Liu, W., Cai, D., Chen, S. (2023) Efficient production of L-asparaginase in *Bacillus licheniformis* by optimizing expression elements and host. *Chinese journal of biotechnology*, **39**(3), 1096-1106. DOI: 10.13345/j.cjb.220642
33. Li, X., Xu, S., Zhang, X., Xu, M., Yang, T., Wang, L., Zhang, H., Fang, H., Osire, T., Yang, S., Rao, Z. (2019) Design of a high-efficiency synthetic system for L-asparaginase production in *Bacillus subtilis*. *Engineering in life sciences*, **19**(3), 229-239. DOI: 10.1002/elsc.201800166
34. Costa-Silva, T.A., Camacho-Córdova, D.I., Agamez-Montalvo, G.S., Parizotto, L.A., Sánchez-Moguel, I., Pessoa-Jr, A. (2019) Optimization of culture conditions and bench-scale production of anticancer enzyme L-asparaginase by submerged fermentation from *Aspergillus terreus* CCT 7693. *Preparative biochemistry & biotechnology*, **49**(1), 95-104. DOI: 10.1080/10826068.2018.1536990
35. Sharma, D., Mishra, A. (2023) Synergistic effects of ternary mixture formulation and process parameters optimization in a sequential approach for enhanced L-asparaginase production using agro-industrial wastes. *Environmental science and pollution research international*, **31**(12), 1-16.

DOI: 10.1007/s11356-023-26977-4

36. Poluri, K.M., Gulati, K. (2017) Rational designing of novel proteins through computational approaches. In: Protein engineering techniques. Springer Briefs in Applied Sciences and Technology. Springer Singapore. pp. 61-83.

DOI: 10.1007/978-981-10-2732-1_3

37. Praveen, P. (2019). Modeling and validation of L-asparaginase enzyme, an anticancer agent using the tools of computational biology. International Journal of Research in Medical Sciences, **8**(1), 211-214, DOI: 10.18203/2320-6012.ijrms20195909

38. Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., Sternberg, M.J. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nature protocols, **10**(6), 845-858. DOI: 10.1038/nprot.2015.053

39. Gileadi, O. (2017) Recombinant protein expression in *E. coli* : A historical perspective. Methods in molecular biology, **1586**, 3-10.

DOI: 10.1007/978-1-4939-6887-9_1

40. Saberianfar, R., Menassa, R. (2018) Strategies to increase expression and accumulation of recombinant proteins. In: Molecular Pharming: Applications, Challenges, and Emerging Areas. (A.R. Kermode and L. Jiang eds.) New York. pp. 119-135. DOI: 10.1002/9781118801512.ch6

41. Shishparenok, A.N., Gladilina, Y.A., Zhdanov, D.D. (2023) Engineering and expression strategies for optimization of L-asparaginase development and production. International journal of molecular sciences, **24**(20), 15220.

DOI: 10.3390/ijms242015220

42. Miranda, J., Lefin, N., Beltran, J., Belén, L.H., Tsipa, A., Farias, J.G., Zamorano, M. (2023) Enzyme engineering strategies for the bioenhancement of L-asparaginase used as a biopharmaceutical. BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy, **37**(6), 793-811.

DOI: 10.1007/s40259-023-00622-5

43. Borek, D., Jaskólski, M. (2001) Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. Acta biochimica Polonica, **48**(4), 893-902.

DOI: 10.18388/abp.2001_3855

44. Michalska, K., Jaskólski, M. (2006). Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations. Acta biochimica Polonica, **53** (4), 627-640.

DOI: 10.18388/abp.2006_3291

45. Castro, D., Marques, A., Almeida, M.R., de Paiva, G.B., Bento, H.B.S., Pedrolli, D.B., Freire, M.G., Tavares, A.P.M., Santos-Ebinuma, V.C. (2021) L-asparaginase production review: bioprocess design and biochemical characteristics. Applied microbiology and biotechnology, **105**(11), 4515-4534. DOI: 10.1007/s00253-021-11359-y

46. Bonthron, D.T., Jaskólski, M. (1997) Why a "benign" mutation kills enzyme activity. Structure-based analysis of the A176V mutant of *Saccharomyces cerevisiae* L-asparaginase I. Acta biochimica Polonica, **44**(3), 491-504.

DOI: 10.18388/abp.1997_4399

47. Lubkowski, J., Wlodawer, A. (2021) Structural and biochemical properties of L-asparaginase. The FEBS journal, **288**(14), 4183-4209.

DOI: 10.1111/febs.16042

48. da Silva, L.S., Doonan, L.B., Pessoa, A. Jr., de Oliveira, M.A., Long, P.F. (2022) Structural and functional diversity of asparaginases: Overview and recommendations for a revised nomenclature. Biotechnology and applied biochemistry, **69**(2), 503-513. DOI: 10.1002/bab.2127

49. Yun, M.K., Nourse, A., White, S.W., Rock, C.O., Heath, R.J. (2007) Crystal structure and allosteric regulation of the cytoplasmic *E. coli* L-asparaginase I. Journal of molecular biology, **369**(3), 794-811. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.03.061

50. Jennings, M.P., Beacham, I.R. (1993) Co-dependent positive regulation of the ansB promoter of *E. coli* by CRP and the FNR protein: a molecular analysis. Molecular microbiology, **9**(1), 155-64.

DOI: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01677.x

51. Dunlop, P.C., Meyer, G.M., Ban, D., Roon, R.J. (1978) Characterization of two forms of asparaginase in *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of biological chemistry, **253**(4), 1297-1304.

DOI: 10.1016/S0021-9258(17)38144-9

52. Dumina, M., Zhgun, A. (2023) Thermo-L-asparaginases: from the role in the viability of thermophiles and hyperthermophiles at high temperatures to a molecular understanding of their thermoactivity and thermostability. International journal of molecular sciences, **24**(3), 2674. DOI: 10.3390/ijms24032674

53. Pokrovskaya, M.V., Pokrovsky, V.S., Aleksandrova, S.S., Sokolov, N.N., Zhdanov, D.D. (2022) Molecular analysis of L-asparaginases for clarification of the mechanism of action and optimization of pharmacological functions. Pharmaceutics, **14**(3), 599. DOI: 10.3390/pharmaceutics14030599

54. Kotzia, G.A., Lappa, K., Labrou, N.E. (2007) Tailoring structure-function properties of L-asparaginase: engineering resistance to trypsin cleavage. The Biochemical journal, **404**(2), 337-343. DOI: 10.1042/BJ20061708

55. Gesto, D.S., Cerqueira, N.M., Fernandes, P.A., Ramos, M.J. (2013)

Unraveling the Enigmatic Mechanism of L-asparaginase II with Q M/QM Calculations. Journal of the American Chemical Society, **135**(19), 7146-7158. DOI: 10.1021/ja310165u

56. Aghaiypour, K., Wlodawer, A., Lubkowski, J. (2001) Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. Biochemistry, **40**(19), 5655-5664. DOI: 10.1021/bi0029595

57. Upadhyay, A.K., Singh, A., Mukherjee, K.J., Panda, A.K. (2014) Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein. Frontiers in Microbiology, **5**, 486.

DOI: 10.3389/fmicb.2014.00486

58. Maurizi, M.R. (1992) Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. Experientia, **48**(2), 178-201. DOI: 10.1007/BF01923511

59. Wülfing, C., Plückthun, A. (1994) Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. Molecular microbiology, **12**(5), 685-692.

DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb01056.x

60. Papageorgiou, A.C., Posypanova, G.A., Andersson, C.S., Sokolov, N.N., Krasotkina, J. (2008) Structural and functional insights into *Erwinia carotovora* L-asparaginase. The FEBS journal, **275**(17), 4306-4316.

DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06574.x

61. Swain, A.L., Jaskólski, M., Housset, D., Rao, J.K., Wlodawer, A. (1993) Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **90**(4), 1474-1478. DOI: 10.1073/pnas.90.4.1474

62. Pokrovskaya, M.V., Pokrovskiy, V.S., Aleksandrova, S.S., Anisimova, N.I., Andrianov, R.M., Treschalina, E.M., Ponomarev, G.V., Sokolov, N.N. (2013). Recombinant intracellular *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase with low L-glutaminase activity and antiproliferative effect. Biomeditsinskaya Khimiya, **59**(2), 192-208. DOI: 10.18097/pbm20135902192

63. Palm, G.J., Lubkowski, J., Derst, C., Schleper, S., Röhm, K.H., Wlodawer, A. (1996) A covalently bound catalytic intermediate in *Escherichia coli* asparaginase: crystal structure of a Thr-89-Val mutant. FEBS letters, **390**(2), 211-216. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00660-6

64. El-Ghonemy, D. (2014) Microbial amidases and their industrial applications: A review. Journal of Medical Microbiology and Diagnosis, **4**, 1-6. DOI: 10.4172/2161-0703.1000173

65. Borek, D., Kozak, M., Pei, J., Jaskólski, M. (2014) Crystal structure of active site mutant of antileukemic L-asparaginase reveals conserved zinc-binding site. The FEBS journal, **81**(18), 4097-4111. DOI: 10.1111/febs.12906

66. Nguyen, H.A., Su, Y., Lavie, A. (2016) Design and characterization of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase variants with diminished L-glutaminase activity. The Journal of biological chemistry, **291**(34), 17664-17676. DOI: 10.1074/jbc.M116.728485

67. Nguyen, H.A., Su, Y., Lavie, A. (2016) Structural insight into substrate selectivity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. Biochemistry, **55**(8), 1246-1253. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b01351

68. Nguyen, H.A., Durden, D.L., Lavie, A. (2017) The differential ability of asparagine and glutamine in promoting the closed/active enzyme conformation rationalizes the *Wolinetella succinogenes* L-asparaginase substrate specificity. Scientific reports, **7**, 41643. DOI: 10.1038/srep41643

69. Lubkowski, J., Wlodawer, A. (2019) Geometric considerations support the double-displacement catalytic mechanism of L-asparaginase. Protein science: a publication of the Protein Society, **28**(10), 1850-1864. DOI: 10.1002/pro.3709

70. Lubkowski, J., Vanegas, J.M., Chan, W.K., Lorenzi, P., Weinstein, J., Sukharev, S., Fushman, D., Rempe, S., Anishkin, A., Wlodawer, A. (2020) Mechanism of catalysis by L-asparaginase. Biochemistry, **59**(20), 1927-1945. DOI: 10.1021/acs.biochem.0c00116

71. Min Yao, Yoshiaki Yasutake, Hazuki Morita, Isao Tanaka. Structure of the type I L-asparaginase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* at 2.16 Å resolution Acta Crystallographica Section D: Structural Biology (2005) **61**(Pt 3):294-301. DOI: 10.1107/S0907444904032950

72. Tomar, R., Garg, D.K., Mishra, R., Thakur, A.K., Kundu, B. (2013) N-terminal domain of *Pyrococcus furiosus* L-asparaginase functions as a non-specific, stable, molecular chaperone. The FEBS journal, **280**(11), 2688-2699. DOI: 10.1111/febs.12271

73. Pritsa, A.A., Kyriakidis, D.A. (2001) L-asparaginase of *Thermus thermophilus*: Purification, properties and identification of essential amino acids for its catalytic activity. Molecular and cellular biochemistry, **216** (1-2), 93-101. DOI: 10.1023/a:1011066129771

74. Derst, C., Henseling, J., Röhm, K.H. (1992) Probing the role of threonine and serine residues of *E. coli* asparaginase II by site-specific mutagenesis. Protein engineering, **5**(8), 785-789. DOI: 10.1093/protein/5.8.785

75. Derst, C., Henseling, J., Röhm, K.H. (2000) Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase. II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. Protein

science: a publication of the Protein Society, **9**(10), 2009-2017. DOI: 10.1110/ps.9.10.2009

76. Derst, C., Wehner, A., Specht, V., Röhm, K.H. (1994) States and functions of tyrosine residues in *Escherichia coli* asparaginase II. European journal of biochemistry, **224**(2), 533-540. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.00533.x

77. Bansal, S., Srivastava, A., Mukherjee, G., Pandey, R., Verma, A., K. Mishra, P., Kundu, B. (2012) Hyperthermophilic asparaginase mutants with enhanced substrate affinity and antineoplastic activity: structural insights on their mechanism of action. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, **26**(3), 1161-1171. DOI: 10.1096/fj.11-191254

78. Offman, M.N., Krol, M., Patel, N., Krishnan, S., Liu, J., Saha, V., Bates, P.A. (2011) Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. Blood, **117**(5), 1614-1621. DOI: 10.1182/blood-2010-07-298422

79. Costa, I.M., Schultz, L., de Araujo Bianchi, P.B., Leite, M.S., Farsky, S.H., de Oliveira, M.A., Pessoa, A., Monteiro, G. (2016) Recombinant L-asparaginase I from *Saccharomyces cerevisiae*: an allosteric enzyme with antineoplastic activity. Scientific reports, **6**(1), 36239. DOI: 10.1038/srep36239

80. Karamitros, C.S., Konrad, M. (2014) Bacterial co-expression of the α and β protomers of human L-asparaginase-3: Achieving essential N-terminal exposure of a catalytically critical threonine located in the β -subunit. Protein expression and purification, **93**, 1-10. DOI: 10.1016/j.pep.2013.10.007

81. Karamitros, C.S., Konrad, M. (2014) Human 60-kDa lysophospholipase contains an N-terminal L-asparaginase domain that is allosterically regulated by L-asparagine. The Journal of biological chemistry, **289**(19), 12962-12975. DOI: 10.1074/jbc.M113.545038

82. Maqsood, B., Basit, A., Khurshid, M., Bashir, Q. (2020) Characterization of a thermostable, allosteric L-asparaginase from *Anoxybacillus flavithermus*. International journal of biological macromolecules, **152**, 584-592. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.246

83. Mihooliya, K.N., Nitika, N., Bhambure, R., Rathore, A. (2022) Post-refolding stability considerations for optimization of in-vitro refolding: L-asparaginase as a case study. Biotechnology journal, **18**(4), 2200505. DOI: 10.1002/biot.202200505

84. Schymkowitz, J., Borg, J., Stricher, F., Nys, R., Rousseau, F., Serrano, L. (2005) The FoldX web server: an online force field. Nucleic acids research, **33**(Web Server issue):W382-8. DOI: 10.1093/nar/gki387

85. Dastmalchi, M., Alizadeh, M., Jamshidi-Kandjan, O., Rezazadeh, H., Hamzeh-Mivehroud, M., Farajollahi, M.M., Dastmalchi, S. (2023) Expression and biological evaluation of an engineered recombinant L-asparaginase designed by *In Silico* method based on sequence of the enzyme from *Escherichia coli*. Advanced pharmaceutical bulletin, **13**(4), 827-836. DOI: 10.34172/apb.2023.085

86. Goyal, G., Bhatt, V.R. (2015) L-asparaginase and venous thromboembolism in acute lymphocytic leukemia. Future oncology (London, England), **11**(17), 2459-2470. DOI: 10.22217/fon.15.114

87. Schmiegelow, K., Attarbaschi, A., Barzilai, S., Escherich, G., Frandsen, T., Halsey, C., Hough, R., Jeha, S., Kato, M., Liang, D.C., Mikkelsen, T.S., Möricke, A., Niinimäki, R., Piette, C., Putti, M.C., Raetz, E., Silverman, L.B., Skinner, R., Tuckuviene, R., van der Sluis, I., Zapotocka, E. (2016) Consensus definitions of 14 severe acute toxic effects for childhood lymphoblastic leukaemia treatment: A delphi consensus. The Lancet. Oncology, **17** (6), e231-e239. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30035-3

88. Zhang, Z.X., Nong, F.T., Wang, Y.Z., Yan, C.-X., Gu, Y., Song, P., Sun, X.M. (2022) Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: alleviating the host burden and enhancing protein activity. Microbial Cell Factories, **21**(1), 191. DOI: 10.1186/s12934-022-01917-y

89. Zhang, S., Sun, Y., Zhang, L., Zhang, F., Gao, W. (2023) Thermoresponsive polypeptide fused L-asparaginase with mitigated immunogenicity and enhanced efficacy in treating hematologic malignancies. Advanced science (Weinheim, Baden-Württemberg, Germany), **10**(23):e2300469. DOI: 10.1002/adv.202300469

90. Zhang, W., Dai, Q., Huang, Z., Xu, W. (2023) Identification and thermostability modification of the mesophilic L-asparaginase from *Limosilactobacillus secaliphilus*. Applied biochemistry and biotechnology, **196**(6), 1-15. DOI: 10.1007/s12010-023-04715-3

91. Kishore, V., Nishita, K.P., Manonmani, H.K. (2015) Cloning, expression and characterization of L-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens* for large scale production in *E. coli* BL21. 3 Biotech. **5**(6), 975-981. DOI: 10.1007/s13205-015-0300-y

92. Wang, Y., Xu, W., Wu, H., Zhang, W., Guang, C., Mu, W. (2021) Microbial production, molecular modification, and practical application of

L-Asparaginase: A review. International journal of biological macromolecules, **186**, 975-983. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.107

93. Pokrovskaya, M.V., Aleksandrova, S.S., Pokrovsky, V.S., Omeljanjuk, N.M., Borisova A.A., Anisimova, N.Y., Sokolov, N.N. (2012) Cloning, expression and characterization of the recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase. Protein expression and purification, **82**(1), 150-154. DOI: 10.1016/j.pep.2011.12.005

94. Maggi, M., Mittelman, S.D., Parmentier, J.H., Colombo, G., Meli, M., Whitmire, J.M., Merrell, D.S., Whitelegge, J., Scotti, C. (2017) A protease-resistant *Escherichia coli* asparaginase with outstanding stability and enhanced anti-leukaemic activity in vitro. Scientific reports, **7**(1), 14479. DOI: 10.1038/s41598-017-15075-4

95. Mahboobi, M., Salmanian, A.H., Sedighian, H., Bambai, B. (2023) Molecular modeling and optimization of type II *E.coli* L-asparaginase activity by *in silico* design and in vitro site-directed mutagenesis. The protein journal, **42**(6), 664-674. DOI: 10.1007/s10930-023-10149-x

96. Mahboobi, M., Sedighian, H., Hedayati, M., Bambai, B., Saeed, E., Soofian, A.J. (2017) Applying bioinformatic tools for modeling and modifying type II *E.coli* L-asparaginase to present a better therapeutic agent/drug for acute lymphoblastic leukemia. International Journal of Cancer Management, **10**(3), e5785. DOI: 10.5812/ijcm.5785

97. Ln, R., Doble, M., Rekha, V.P., Pulicherla, K.K. (2011) *In silico* engineering of L-asparaginase to have reduced glutaminase side activity for effective treatment of acute lymphoblastic leukemia. Journal of pediatric hematology/oncology, **33**(8), 617-621. DOI: 10.1097/MPH.0b013e31822aa4ec

98. Ardalan, N., Akhavan, S.A., Khavari-Nejad, R. (2021) Development of *Escherichia coli* asparaginase II for the treatment of acute lymphocytic leukemia: in silico reduction of asparaginase II side effects by a novel mutant (V27F). Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP, **22**(4), 1137-1147. DOI: 10.31557/APJCP.2021.22.4.1137-1147

99. Song, Z., Zhang, Q., Wu, W., Pu, Z., Yu, H. (2023) Rational design of enzyme activity and enantioselectivity. Frontiers in bioengineering and biotechnology, **11**, 1129149. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1129149

100. Korendovych, I.V. (2018) Rational and semirational protein design. Methods in molecular biology, **1685**, 15-23. DOI: 10.1007/978-1-4939-7366-8_2

101. Sellés V.L., Isalan, M., Heap, J.T., Ledesma-Amaro, R. (2023) A primer to directed evolution: current methodologies and future directions. RSC chemical biology, **4**(4), 271-291. DOI: 10.1039/d2cb00231k

102. Zeymer, C., Hilvert, D. (2018) Directed evolution of protein catalysts. Annual review of biochemistry, **87**, 131-157. DOI: 10.1146/annurev-biochem-062917-012034

103. Karamitros, C.S., Konrad, M. (2016) Fluorescence-activated cell sorting of human L-asparaginase mutant libraries for detecting enzyme variants with enhanced activity. ACS chemical biology, **11**(9), 2596-2607. DOI: 10.1021/acschembio.6b00283

104. Beckett, A., Gervais, D. (2019) What makes a good new therapeutic L-asparaginase? World journal of microbiology & biotechnology, **35**(10), 152. DOI: 10.1007/s11274-019-2731-9

105. Lopes, W., Santos, B.A.F.D., Sampaio, A.L.F., Gregório Alves Fontão, A.P., Nascimento, H.J., Jurgilas, P.B., Torres, F.A.G., Bon, E.P.D.S., Almeida, R.V., Ferrara, M.A. (2019) Expression, purification, and characterization of asparaginase II from *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli*. Protein expression and purification, **159**, 21-26. DOI: 10.1016/j.pep.2019.02.012

106. Ali, M., Ishqi, H.M., Husain, Q. (2020) Enzyme engineering: reshaping the biocatalytic functions. Biotechnology and bioengineering, **117**(6), 1877-1894. DOI: 10.1002/bit.27329

107. Pongsupasa, V., Anuwat, P., Maenpuen, S., Wongnate, T. (2021) Rational-design engineering to improve enzyme thermostability. Methods in molecular biology, **2397**, 159-178. DOI: 10.1007/978-1-0716-1826-4_9

108. Xie, W.J., Asadi, M., Warshel, A. (2022) Enhancing computational enzyme design by a maximum entropy strategy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **119**(7), e2122355119. DOI: 10.1073/pnas.2122355119

109. Vasina, M., Velecký, J., Planas-Iglesias, J., Marques, S.M., Skarupova, J., Damborsky, J., Bednar, D., Mazurenko, S., Prokop, Z. (2022) Tools for computational design and high-throughput screening of therapeutic enzymes. Advanced drug delivery reviews, **183**(1), 114143. DOI: 10.1016/j.addr.2022.114143

110. Chi, H., Wang, Y., Xia, B., Zhou, Y., Lu, Z., Lu, F., Zhu, P. (2022) Enhanced thermostability and molecular insights for L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* via structure- and computation-based rational design. Journal of agricultural and food chemistry, **70**(45), 14499-14509. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c05712

111. Marcos, E., Silva, D.A. (2018) Essentials of *de novo* protein design: Methods and applications. Wiley interdisciplinary reviews: Computational Molecular Science, **8**(6), e1374(6110). DOI: 10.1002/wcms.1374
112. Ferreira, P., Fernandes, P.A., Ramos, M.J. (2022) Modern computational methods for rational enzyme engineering. Chem Catalysis, **2**(10), 2481-2498. DOI: 10.1016/j.checat.2022.09.036
113. Nguyen, T.T.H., Nguyen, C. T., Nguyen, T. S.L., Du, T. T. (2016). Optimization, purification and characterization of recombinant L-asparaginase II in *Escherichia coli*. African Journal of Biotechnology, **15**(31), 1681-1691. DOI: 10.5897/ajb2016.15425
114. Nguyen, H.A., Su, Y., Zhang, J.Y., Antanasijevic, A., Caffrey, A.M., Schalk, A., Liu, L., Rondelli, D., Oh, A., Mahmud, D.L., Bosland, M.C., Kajdacsy-Balla, A., Peirs, S., Lammens, T., Mondelaers, V., De Moerloose, B., Goossens, S., Schlicht, M.J., Kabirow, K.K., Lyubimov, A.V., Merrill, B.J., Saunthararajah, Y., Van Vlierberghe, P.V., Lavie, A. (2018) A novel L-asparaginase with low L-glutaminase coactivity is highly efficacious against both T- and B-cell acute lymphoblastic leukemias in vivo. Cancer research, **78**(6), 1549-1560. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2106
115. Costa, I.M., Custódio, D., Lima, G.M., Pessoa, A., dos Santos, C.O., Oliveira, M.A., Monteiro, G. (2022). Engineered asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* enhances asparagine hydrolase activity and diminishes enzyme immunoreactivity- a new promise to treat acute lymphoblastic leukemia. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **97**(1), 228-239. DOI: 10.1002/jctb.6933
116. Linshu, J., Chi, H., Xia, B., Lu, Z., Bie, X., Zhao, H., Lu, F., Chen, M. (2022) Thermostability Improvement of L-asparaginase from *Acinetobacter soli* via Consensus-Designed Cysteine Residue Substitution. Molecules, **27**(19), 6670. DOI: 10.3390/molecules27196670
117. Sudhir, A.P., Agarwal, V.V., Dave, B.R., Patel, D.H., Subramanian, R.B. (2016) Enhanced catalysis of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* by a rational redesign. Enzyme and microbial technology, **86**, 1-6. DOI: 10.1016/j.enzmtec.2015.11.010
118. Zhou, Y., Jiao, L., Shen, J., Chi, H., Lu, Z., Liu, H., Lu, F., Zhu, P. (2022) Enhancing the catalytic activity of type II L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* through semi-rational design. International journal of molecular sciences, **23**(17), 9663. DOI: 10.3390/ijms23179663
119. Baral, A., Gorkhali, R., Basnet, A., Koirala, S., Bhattarai, H.K. (2021) Selection of the optimal L-asparaginase II against acute lymphoblastic leukemia: an *in silico* approach. JMIRx Med, **2**(3), e29844. DOI: 10.2196/29844
120. Long, S., Zhang, X., Rao, Z., Chen, K., Xu, M., Yang, T., Yang, S. (2016) Amino acid residues adjacent to the catalytic cavity of tetramer L-asparaginase II contribute significantly to its catalytic efficiency and thermostability. Enzyme and microbial technology, **82**, 15-22. DOI: 10.1016/j.enzmtec.2015.08.009
121. Kotzia, G.A., Labrou, N.E. (2009) Engineering thermal stability of L-asparaginase by *in vitro* directed evolution. The FEBS journal, **276**(6), 1750-1761. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.06910.x
122. Pokrovskaya, M.V., Aleksandrova, S.S., Pokrovsky, V.S., Veselovsky, A.V., Grishin D.V., Abakumova, O.Y., Podobed, O.V., Mishin, A.A., Zhdanov, D.D., Sokolov, N.N. (2015) Identification of functional regions in the *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase by site-directed mutagenesis. Molecular Biotechnology, **57**(3), 251-264. DOI: 10.1007/s12033-014-9819-0
123. Lu, X., Chen, J., Jiao, L., Zhong, L., Lu, Z., Zhang, C., Lu, F. (2019) Improvement of the activity of L-asparaginase I improvement of the catalytic activity of L-asparaginase I from *Bacillus megaterium* H-1 by *in vitro* directed evolution. Journal of bioscience and bioengineering, **128**(6), 683-689. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2019.06.001
124. Aghaeepoor, M., Akbarzadeh, A., Mirzaie, S., Hadian, A., Jamshidi Aval, S., Dehnavi, E. (2018) Selective reduction in glutaminase activity of L-Asparaginase by asparagine 248 to serine mutation: A combined computational and experimental effort in blood cancer treatment. International journal of biological macromolecules, **120**(Pt B), 2448-2457. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.015
125. Faber, M.S., Whitehead, T.A. (2019) Data-driven engineering of protein therapeutics. Current opinion in biotechnology, **60**, 104-110. DOI: 10.1016/j.copbio.2019.01.015
126. Sannikova, E.P., Bulushova, N.V., Cheperegin, S.E., Gubaydullin, I.I., Chestukhina, G.G., Ryabichenko, V.V., Zalunin, I.A., Kotlova, E.K., Konstantinova, G.E., Kubasova, T.S., Shtil, A.A., Pokrovsky, V.S., Yarotsky, S.V., Efremov, B.D., Kozlov, D.G. (2016) The modified heparin-binding L-asparaginase of *Wolinella succinogenes*. Molecular biotechnology, **58**(8-9), 528-539. DOI: 10.1007/s12033-016-9950-1
127. Belén, L.H., Lissabet, J.B., de Oliveira Rangel-Yagui, C., Effer, B., Monteiro, G., Pessoa, A., Farias Avendaño, J.G. (2019) A structural *in silico* analysis of the immunogenicity of L-asparaginase from *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora*. Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization, **59**, 47-55. DOI: 10.1016/j.biologicals.2019.03.003
128. Cantor, J.R., Yoo, T.H., Dixit, A., Iverson, B.L., Forsthuber, T.G., Georgiou, G. (2011) Therapeutic enzyme deimmunization by combinatorial T-cell epitope removal using neutral drift. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **108**(4), 1272-1277. DOI: 10.1073/pnas.1014739108
129. Cantor, J.R., Panayiotou, V., Agnello, G., Georgiou, G., Stone, E.M. (2012) Engineering reduced-immunogenicity enzymes for amino acid depletion therapy in cancer. Methods in enzymology, **502**, 291-319. DOI: 10.1016/B978-0-12-416039-2.00015-X
130. Alexandrova, S.S., Gladilina, Y.A., Pokrovskaya, M.V., Sokolov, N.N., Zhdanov D.D. (2022) Mechanisms of development of side effects and drug resistance to L-asparaginase and ways to overcome them. Biomeditsinskaya khimiia, **68**(2), 104-116. DOI: 10.18097/PBMC20226802104
131. Pokrovskaya, M.V., Zhdanov, D.D., Eldarov, M.A., Aleksandrova, S.S., Veselovskiy, A.V., Pokrovskiy, V.S., Grishin, D.V., Gladilina, J.A., Sokolov, N.N. (2017) Suppression of telomerase activity leukemic cells by mutant forms of *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase. Biomeditsinskaya Khimiya, **63**(1), 62-74. DOI: 10.18097/PBMC20176301062
132. Gupta, S.K., Shukla, P. (2016) Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. Critical reviews in biotechnology, **36**(6), 1089-1098. DOI: 10.3109/07388551.2015.1084264
133. Kant Bhatia, S., Vivek, N., Kumar, V., Chandel, N., Thakur, M., Kumar, D., Yang, Y., Pugazendhi, A., Kumar, G. (2021) Molecular biology interventions for activity improvement and production of industrial enzymes. Bioresource technology, **324**, 124596. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.124596
134. Rieder, L., Teuschler, N., Ebner, K., Glieder, A. (2019). Eukaryotic expression systems for industrial enzymes. In Industrial Enzyme Applications (A. Vogel and O. May eds.)Wiley-VCH, pp. 47-69. DOI: 10.1002/9783527813780.ch1_3.
135. Terpe, K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Applied microbiology and biotechnology, **72**(2), 211-222. DOI: 10.1007/s00253-006-0465-8
136. Datar, R.V., Cartwright, T., Rosen, C.G. (1993) Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. Biotechnology (N Y), **11**(3), 349-357. DOI: 10.1038/nbt0393-349
137. John, N. Abelson, David V. Goeddel, Melvin I. Simon (1990) Gene expression technology. In methods in enzymology, (David V. Goeddel Ed.) Academic Press, San Diego, **185**, pp. 3-681
138. Dell, A., Galadari, A., Sastre, F., Hitchen, P. (2010) Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. International journal of microbiology, **2010**, 148178. DOI: 10.1155/2010/148178
139. Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. Glycobiology, **3**(2), 97-130. DOI: 10.1093/glycob/3.2.97
140. Withka, J.M., Wyss, D.F., Wagner, G., Arulanandam, A.R., Reinherz, E.L., Recny, M.A. (1993) Structure of the glycosylated adhesion domain of human T lymphocyte glycoprotein CD2. Structure (London, England), **1**(1), 69-81. DOI: 10.1016/0969-2126(93)90009-6
141. Elliott, S., Lorenzini, T., Asher, S., Aoki, K., Brankow, D., Buck, L., Busse, L., Chang, D., Fuller, J., Grant, J., Hernday, N., Hokum, M., Hu, S., Knudsen, A., Levin, N., Komorowski, R., Martin, F., Navarro, R., Osslund, T., Rogers, G., Rogers, N., Trail, G., Egrie, J. (2003) Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. Nature biotechnology, **21**(4), 414-421. DOI: 10.1038/nbt799
142. Flintegaard, T.V., Thygesen, P., Rahbek-Nielsen, H., Levery, S.B., Kristensen, C., Clausen, H., Bolt, G. (2010) N-glycosylation increases the circulatory half-life of human growth hormone. Endocrinology, **151**(11), 5326-5336. DOI: 10.1210/en.2010-0574
143. Solá, R.J., Griebenow, K. (2009) Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. Journal of pharmaceutical sciences, **98**(4), 1223-1245. DOI: 10.1002/jps.21504
144. Sadoulet, M.O., Franceschi, C., Aubert, M., Silvy, F., Bernard, J.P., Lombardo, D., Mas, E. (2007) Glycoengineering of alpha Gal xenoantigen on recombinant peptide bearing the J28 pancreatic oncofetal glycotope. Glycobiology, **17**(6), 620-630. DOI: 10.1093/glycob/cwm028
145. Wacker, M., Wang, L., Kowarik, M., Dowd, M., Lipowsky, G., Faridmayer, A., Shields, K., Park, S., Alaimo, C., Kelley, K.A., Braun, M., Quebatte, J., Gambillara, V., Carranza, P., Steffen, M., Lee, J.C. (2014) Prevention of

- Staphylococcus aureus* infections by glycoprotein vaccines synthesized in *Escherichia coli*. The Journal of infectious diseases, **209**(10), 1551-1561. DOI: 10.1093/infdis/jit800
146. Sinclair, A.M., Elliott, S. (2005) Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. Journal of pharmaceutical sciences, **94**(8), 1626-1635. DOI: 10.1002/jps.20319
147. Feige, M.J., Braakman, L., Hendershot, L.M. (2018) Disulfide bonds in protein folding and stability. In oxidative folding of proteins: basic principles, cellular regulation and engineering, (M. J. Feige ed.) The Royal Society of Chemistry, 1-33. DOI: 10.1039/9781788013253-00001
148. Thornton, J.M. (1981) Disulphide bridges in globular proteins. Journal of molecular biology, **151**(2), 261-287. DOI: 10.1016/0022-2836(81)90515-5
149. Ferrara, M.A., Severino, N.M.B., Mansure, J.J., Martins, A.S., Oliveira, E., Siani, A.C., Jr, N.P., Torres, F.A., Bon, E.P.S. (2006) Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. Enzyme and Microbial Technology, **39** (7), 1457-1463. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.03.036
150. Vitaladevaram, V. (2021) A Short communication on *Pichia pastoris* vs. *E. coli*: Efficient expression system. Annals of Proteomics and Bioinformatics, **5**(1), 49-50. DOI: 10.29328/journal.apb.1001016
151. Jacobs, P., Geysens, S., Verweken, W., Contreras, R.H., Callewaert, N. (2009) Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. Nature protocols, **4**(1), 58-70. DOI: 10.1038/nprot.2008.213
152. Pan, Y., Yang, J., Wu, J., Yang, L., Fang, H. (2022) Current advances of *Pichia pastoris* as cell factories for production of recombinant proteins. Frontiers in Microbiology, **13**(1), 1059777. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1059777
153. Juturu, V., Wu, J.C (2018) Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: latest research progress and applications. Chembiochem : a European journal of chemical biology, **19**(1), 7-21. DOI: 10.1002/cbic.201700460
154. Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., Schwab, H. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Applied microbiology and biotechnology, **98**(12), 5301-5317. DOI: 10.1007/s00253-014-5732-5
155. Rodrigues, D., Pillaca-Pullo, O., Torres-Obreque, K., Flores-Santos, J., Sánchez-Moguel, I., Pimenta, M.V., Basi, T., Converti, A., Lopes, A.M., Monteiro, G., Fonseca, L.P., Pessoa, A.J. (2019) Fed-batch production of *Saccharomyces cerevisiae* L-asparaginase II by recombinant *Pichia pastoris* MUTs strain. Frontiers in bioengineering and biotechnology, **7**, 16. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00016
156. Karbalaee, M., Rezaee, S.A., Farsiani, H. (2020) *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. Journal of cellular physiology, **235**(9), 5867-5881. DOI: 10.1002/jcp.29583
157. Parizotto, L., Kleingesinds, E., da Rosa, L.M.P., Roldán E.B., Lima, G.M., Herkenhoff, M.E., Li, Z., Rinas, U., Monteiro, G., Pessoa, A., Tonso, A. (2021) Increased glycosylated L-asparaginase production through selection of *Pichia pastoris* platforma and oxygen-methanol control in fed-batches. Biochemical Engineering Journal, **173**, 108083. DOI: 10.1016/j.bej.2021.108083
158. Lima, G.M., Roldán, B.E., Biasoto, H.P., Feijoli, V., Pessoa, A., Palmisano, G., Monteiro, G. (2020) Glycosylation of L-asparaginase from *E. coli* through yeast expression and site-directed mutagenesis. Biochemical Engineering Journal, **156**, 107516. DOI: 10.1016/j.bej.2020.107516
159. Nguyen, T.C., Nguyen, T.T.H., Tuyen, Do.T., Thi, Quyen D.T.(2014). Expression, purification and evaluation of recombinant L-asparaginase in methylothrophic *Pichia pastoris*. Journal of Vietnamese Environment, **6**(3), 288-292. DOI: 10.13141/jve.vol6.no3.pp288-292
160. Effer, B., Kleingesinds, E.K., Lima, G.M., Costa, I.M., Sánchez-Moguel, I., Pessoa, A., Santiago, V.F., Palmisano, G., Farias, J.G., Monteiro, G. (2020) Glycosylation of Erwinase results in active protein less recognized by antibodies. Biochemical Engineering Journal, **163**(301), 107750. DOI: 10.1016/j.bej.2020.107750
161. Sajitha, S., Vidya, J., Varsha, Karunakaran , Binod, P., Pandey, A. (2015) Cloning and expression of L-asparaginase from *E.coli* in eukaryotic expression system. Biochemical Engineering Journal, **102**, 14-17. DOI: 10.1016/j.bej.2015.02.027
162. Dantas, R.C, Caetano, L.F., Torres, A.L.S., Alves, M.S., Silva, E.T.M.F., Teixeira, L.P.R., Teixeira, D.C., de Azevedo Moreira, R., Fonseca, M.H.G., Gaudêncio Neto, Martins, L.T., Furtado, G.P., Tavares, K.C.S. (2019) Expression of a recombinant bacterial L-asparaginase in human cells. BMC research notes, **12**(1), 794. DOI: 10.1186/s13104-019-4836-5
163. Gupta, R., Jung, E., Brunak, S. (2004). Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. In: Preparation, **46**, 203-206
164. Zhou, Q., Qiu, H. (2019) The Mechanistic impact of N-glycosylation on stability, pharmacokinetics, and immunogenicity of therapeutic proteins. Journal of pharmaceutical sciences, **108**(4), 1366-1377. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.11.029
165. Gribben, J.G., Devereux, S., Thomas, N.S., Keim, M., Jones, H.M., Goldstone, A.H., Linch, D.C. (1990) Development of antibodies to unprotected glycosylation sites on recombinant human GM-CSF. Lancet, **335**(8687), 434-437. DOI: 10.1016/0140-6736(90)90665-r
166. Hermeling, S., Crommelin, D.J., Shellekens, H., Jiskoot, W. (2004) Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. Pharmaceutical Research, **21**(6), 897-903, DOI: 10.1023/b:pham.0000029275.41323.a6
167. Pouresmaeil, M., Azizi-Dargahlou, S. (2023) Factors involved in heterologous expression of proteins in *E. coli* host. Archives of microbiology, **205**(5), 212. DOI: 10.1007/s00203-023-03541-9
168. Khushoo, A., Pal, Y., Mukherjee, K.J. (2005) Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in *Escherichia coli* in shake-flask and bioreactor. Applied microbiology and biotechnology, **68**(2), 189-197. DOI: 10.1007/s00253-004-1867-0
169. Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A. (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Frontiers in Microbiology, **5**(172), 172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172
170. Derman, A.I., Prinz, W.A., Belin, D., Beckwith, J. (1993) Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. Science, **262**(5140), 1744-1747. DOI: 10.1126/science.8259521
171. Wang, Y., Qian, S., Meng, G., Zhang, S. (2001) Cloning and expression of L-asparaginase gene in *Escherichia coli*. Applied biochemistry and biotechnology, **95**(2), 93-101. DOI: 10.1385/abab:95:2:093
172. Goswami, R., Hegde, K., Dasu, V.V.(2015) Production and characterization of novel glutaminase free recombinant L-asparaginase II of *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica SCRI 1043 in *E. coli* BL21 (DE3). British Microbiology Research Journal, **6**(2), 95-112. DOI: 10.9734/BMRJ/2015/13867
173. Chand, S., Mahajan, R.V., Prasad, J.P., Sahoo, D.K., Mihooliya, K.N., Dhar, M.S., Sharma, G. (2020) A comprehensive review on microbial L-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications. Biotechnology and applied biochemistry, **67**(4), 619-647. DOI: 10.1002/bab.1888
174. Chi, H., Chen, M., Jiao, L., Lu, Z., Bie, X., Zhao, H., Lu, F. (2021) Characterization of a novel L-asparaginase from *Mycobacterium goodii* with acrylamide mitigation potential. Foods, **10**(11), 2819. DOI: 10.3390/foods10112819
175. Pourhossein, M., Korbekandi, H. (2014) Cloning, expression, purification and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase in *Escherichia coli*. Advanced biomedical research, **3**(1), 82. DOI: 10.4103/2277-9175.127995
176. Dumina, M.V., Zhgun, A.A., Pokrovskaya, M.V., Aleksandrova, S.S., Zhdanov, D.D., Sokolov, N.N., El'darov, M.A. (2021) Comparison of enzymatic activity of novel recombinant L-asparaginases of extremophiles. Applied Biochemistry and Microbiology, **57**(5), 594-602. DOI: 10.1134/S0003683821050057
177. Abdullah, E. M., Khan, M. S., Aziz, I. M., Alokail, M. S., Karthikeyan, S., Rupavarshini, M., Bhat, S. A., Ataya, F. S. (2024). Expression, characterization and cytotoxicity of recombinant L-asparaginase II from *Salmonella paratyphi* cloned in *Escherichia coli*. International journal of biological macromolecules, **279**(Pt 4), 135458. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.135458
178. Dumina, M., Zhgun, A., Pokrovskaya, M., Aleksandrova, S., Zhdanov, D., Sokolov, N., El'darov, M. (2021) A novel L-asparaginase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus sibiricus*: heterologous expression and characterization for biotechnology application. International journal of molecular sciences, **22**(18), 9894. DOI: 10.3390/ijms22189894
179. Farahat, M.G., Amr, D., Galal, A. (2020) Molecular cloning, structural modeling and characterization of a novel glutaminase-free L-asparaginase from *Cobetia amphilecti* AM16. International journal of biological macromolecules, **143**, 685-695. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.258
180. Kumar, V., Kumar, R., Sharma, S., Shah, A., Prakash Chaturvedi, C., Verma, D. (2024) Cloning, expression, and characterization of a novel thermo-acidophilic L-asparaginase of *Pseudomonas aeruginosa* CSPA.3. *Biotech* **14**, 54. DOI: 10.1007/s13205-024-03916-9
181. Izadpanah Qeshmi, F., Homaei, A., Khajeh, K., Kamrani, E., Fernandes, P. (2022) Production of a novel marine *Pseudomonas aeruginosa* recombinant L-asparaginase: insight on the structure and biochemical characterization. Marine Biotechnology, **24**(3), 599-613. DOI: 10.1007/s10126-022-10129-9
182. Karamitros, C.S., Labrou, N. (2014). Extracellular expression and affinity purification of L-asparaginase from *E. chrysanthemi* in *E. coli*. Sustainable Chemical Processes, **2**(1), 16. DOI: 10.1186/s40508-014-0016-z
183. Meena, B., Anburajan, L., Sathish, T., Vijaya, Raghavan, R., Dharani, G., Vinithkumar, N.V., Kirubakaran, R. (2015) L-Asparaginase from *Streptomyces griseus* NIOT-VKMA29: optimization of process variables using factorial

- designs and molecular characterization of L-asparaginase gene. Scientific reports, **5**(1), 12404. DOI: 10.1038/srep12404
184. Meena, B., Anburajan, L., Dheenan, P.S., Begum, M., Vinihkumar, N.V., Dharani, G., Kirubakaran, R. (2015) Novel glutaminase free L-asparaginase from *Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08: production, optimization, functional and molecular characterization. Bioprocess and Biosystems Engineering, **38**(2), 373-388. DOI: 10.1007/s00449-014-1277-3
185. Meena, B., Anburajan, L., Vinihkumar, N.V., Shridhar, D., Raghavan, R.V., Dharani, G., Kirubakaran, R. (2016) Molecular expression of L-asparaginase gene from *Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08 in *Escherichia coli*: A prospective recombinant enzyme for leukaemia chemotherapy. Gene, **590**(2), 220-226. DOI: 10.1016/j.gene.2016.05.003
186. Hegazy, W., Abdel-Salam, M.S., Moharam, M. (2020). Biotechnological approach for the production of L-asparaginase from locally *Bacillus subtilis* isolate. Egyptian Pharmaceutical Journal. **19**(2), 155-161. 10.4103/epj.epj_35_19
187. de Moura, W.A.F., Schultz, L., Breyer, C.A., de Oliveira A.L.P., Tairum, C.A., Fernandes, G.C., Toyama, M.H., Pessoa-Jr, A., Monteiro, G., de Oliveira, M.A. (2020) Functional and structural evaluation of the antileukaemic enzyme L-asparaginase II expressed at low temperature by different *Escherichia coli* strains. Biotechnology letters, **42**(11), 2333-2344. DOI: 10.1007/s10529-020-02955-5
188. Kotzia, G.A., Labrou, N.E. (2007) L-asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: cloning, expression and characterization. Journal of biotechnology, **127**(4), 657-669. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.07.037
189. Saeed, H., Hemida, A., El-Nikhely, N., Abdel-Fattah, M., Shalaby, M., Hussein, A., Eldoksh, A., Ataya, F., Aly, N., Labrou, N., Nematalla, H. (2020) Highly efficient *Pyrococcus furiosus* recombinant L-asparaginase with no glutaminase activity: Expression, purification, functional characterization, and cytotoxicity on THP-1, A549 and Caco-2 cell lines. International journal of biological macromolecules, **156**(3), 812-828. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.080
190. Chohan, S.M., Rashid, N., Sajed, M., Imanaka, T. (2019) Pcal_0970: an extremely thermostable L-asparaginase from *Pyrobaculum calidifontis* with no detectable glutaminase activity. Folia Microbiol (Praha). **64**(3), 313-320. DOI: 10.1007/s12223-018-0656-6
191. Souza, C.C., Guimarães, J.M., Pereira, S.D.S., Mariúba, L.A.M. (2021) The multifunctionality of expression systems in *Bacillus subtilis*: Emerging devices for the production of recombinant proteins. Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.), **246**(23), 2443-2453. DOI: 10.1177/15353702211030189
192. Gomes, A.R., Byregowda, S.M., Veeragowda, B.M., Vinayagamurthy, Balamurugan. (2016). An Overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. Advances in Animal and Veterinary Sciences, **4**(7), 346-356. DOI:10.14737/journal.aavs/2016/4.7.346.356
193. Niu, J., Meng, F., Zhou, Y., Zhang, C., Lu, Z., Lu, F., Chen, M. (2021). Non-classical secretion of a type I L-asparaginase in *Bacillus subtilis*. International journal of biological macromolecules, **180**, 677-683. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.03.104
194. Yang, H., Qu, J., Zou, W., Shen, W., Chen, X. (2021) An overview and future prospects of recombinant protein production in *Bacillus subtilis*. Applied microbiology and biotechnology, **105**(18), 6607-6626. DOI: 10.1007/s00253-021-11533-2
195. Cui, W., Han, L., Suo, F., Liu, Z., Zhou, L., Zhou, Z. (2018) Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond. World journal of microbiology & biotechnology, **34**(10), 145. DOI: 10.1007/s11274-018-2531-7
196. Bento, H.B.S., Paiva, G.B., Almeida, M.R., Silva, C.G., Carvalho, P.J., Tavares, A.P.M., Pedrolli, D.B., Santos-Ebinuma, V.C. (2022) *Aliivibrio fischeri* L-asparaginase production by engineered *Bacillus subtilis*: a potential new biopharmaceutical. Bioprocess and biosystems engineering, **45**(10), 1635-1644. DOI: 10.1007/s00449-022-02769-x
197. Li, X., Zhang, X., Xu, S., Zhang, H., Xu, M., Yang, T., Wang, L., Qian, H., Zhang, H., Fang, H., Osire, T., Rao, Z., Yang, S. (2018) Simultaneous cell disruption and semi-quantitative activity assays for high-throughput screening of thermostable L-asparaginases. Scientific reports, **8**(1), 7915. DOI: 10.1038/s41598-018-26241-7
198. Chityala, S., Venkata Dasu, V., Ahmad, J., Prakasham, R.S. (2015) High yield expression of novel glutaminase free L-asparaginase II of *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428 in *Bacillus subtilis* WB800N. Bioprocess and Biosystems Engineering, **38**(11), 2271-2284. DOI: 10.1007/s00449-015-1464-x
199. Feng, Y., Liu, S., Jiao, Y., Gao, H., Wang, M., Du, G., Chen, J. (2017) Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 by *B. subtilis* WB600 through a combined strategy. Applied microbiology and biotechnology, **101**(4), 1509-1520. DOI: 10.1007/s00253-016-7816-x
200. Boni, I.V., Isaeva, D.M., Musychenko, M.L., Tzareva, N.V. (1991) Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. Nucleic acids research, **19**(1), 155-162. DOI: 10.1093/nar/19.1.155
201. Oza, V.P., Parmar, P.P., Patel, D.H., Subramanian, R.B. (2011) Cloning, expression and characterization of L-asparaginase from *Withania somnifera* L. for large scale production. 3 Biotechnology, **1**(1), 21-26. DOI: 10.1007/s13205-011-0003-y
202. Jacob, F., Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. Journal of molecular biology, **3**, 318-356. DOI: 10.1016/s0022-2836(61)80072-7
203. Duzenli, O.F., Okay, S. (2020) Promoter engineering for the recombinant protein production in prokaryotic systems. AIMS Bioengineering, **7**(2), 62-81. DOI: 10.3934/bioeng.2020007
204. Deuschle, U., Kammerer, W., Gentz, R., Bujard, H. (1986) Promoters of *Escherichia coli*: a hierarchy of *in vivo* strength indicates alternate structures. The EMBO journal, **5**(11), 2987-2994. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04596.x
205. Gaal, T., Barkei, J., Dickson, R.R., de Boer, H.A., de Haseth, P.L., Alavi, H., Gourse, R.L. (1989) Saturation mutagenesis of an *Escherichia coli* rRNA promoter and initial characterization of promoter variants. Journal of bacteriology, **171**(9), 4852-4861. DOI: 10.1128/jb.171.9.4852-4861.1989
206. Hsu, L.M., Giannini, J.K., Leung, T.W., Crosthwaite, J.C. (1991) Upstream sequence activation of *Escherichia coli* argT promoter *in vivo* and *in vitro*. Biochemistry, **30**(3), 813-822. DOI: 10.1021/bi00217a035
207. Josaitis, C.A., Gaal, T., Ross, W., Gourse, R. L. (1990) Sequences upstream of the-35 hexamer of rrnB P1 affect promoter strength and upstream activation. Biochimica et biophysica acta, **1050**(1-3), 307-311. DOI: 10.1016/0167-4781(90)90186-6
208. Zacharias, M., Göringer, H., U. Wagner, R. (1992) Analysis of the Fis-dependent and Fis-independent transcription activation mechanisms of the *Escherichia coli* ribosomal RNA P1 promoter. Biochemistry. **31**(9), 2621-2628. DOI: 10.1021/bi00124a024
209. Rao, L., Ross, W., Appleman, J.A., Gaal, T., Leirno, S., Schlax, P.J., Record, M.T., Jr., Gourse, R.L. (1994) Factor independent activation of rrnB P1. An "extended" promoter with an upstream element that dramatically increases promoter strength. Journal of molecular biology, **235**(5), 1421-1435. DOI: 10.1006/jmbi.1994.1098
210. Ross, W., Gosink, K.K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K., Gourse, R.L. (1993) A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. Science, **262**(5138), 1407-1413. DOI: 10.1126/science.8248780
211. Lissner, S., Margalit, H. (1993) Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. Nucleic acids research, **21**(7), 1507-1516. DOI: 10.1093/nar/21.7.1507
212. Darwesh, D.B., Al-Awthan, Y.S., Elfaki, I., Habib, S.A., Alnour, T.M., Darwish, A.B., Youssef, M.M. (2022) Anticancer Activity of Extremely Effective Recombinant L-Asparaginase from *Burkholderia pseudomallei*. Journal of microbiology and biotechnology, **325**(5), 551-563. DOI: 10.4014/jmb.2112.12050
213. Saeed, H., Hemida, A., Abdel-Fattah, M., Eldoksh, A., Shalaby, M., Nematalla, H., El-Nikhely, N., Elkewedi, M. (2021) *Pseudomonas aeruginosa* recombinant L-asparaginase: Large scale production, purification, and cytotoxicity on THP-1, MDA-MB-231, A549, Caco2 and HCT-116 cell lines. Protein expression and purification, **181**(2C), 105820. DOI: 10.1016/j.pep.2021.105820
214. Wang, Y., Liu, Q., Weng, H., Shi, Y., Chen, J., Du, G., Kang, Z. (2019) Construction of synthetic promoters by assembling the sigma factor binding -35 and -10 Boxes. Biotechnology journal, **14**(1):e1800298. DOI: 10.1002/biot.201800298
215. Lozano Terol, G., Gallego-Jara, J., Sola Martínez, R.A., Martínez Vivancos, A., Cánovas Díaz, M., de Diego Puente, T. (2021) Impact of the expression system on recombinant protein production in *Escherichia coli* BL21. Frontiers in Microbiology, **12**, 682001. DOI: 10.3389/fmicb.2021.682001
216. Ehl'darov, M. A., Zhgun, A.A., Gervaziev, J.V., Aleksandrova, S.S., Omel'janjuk, N.M., Archakov, A.I. Skryabin, K.G., Sokolov, N.N. Gene encoding L-asparaginase in *Erwinia Carotovora* and strain *Escherichia coli* VKPM = B-8174 as producer of *Erwinia Carotovora* L-asparaginase (Patent No. RF №2221868, MIKC12N, 2004).
217. Jayapal, K.P., Lian, W., Glod, F., Sherman, D.H., Wei-Shou Hu, W.S. Comparative genomic hybridizations reveal absence of large *Streptomyces coelicolor* genomic islands in *Streptomyces lividans*. BMC Genomics **8**, 229 (2007). DOI: 10.1186/1471-2164-8-229
218. Roth, G., Nunes, J.E.S., Rosado, L.A., Bizarro, C., Volpato, G., Nunes, C.P.,

- Renard, G., Basso, L.A., Santos, D.S., Chies, J.M. (2013) Recombinant *Erwinia carotovora* L-asparaginase II production in *Escherichia coli* fed-batch cultures. Brazilian journal of chemical engineering, **30**(2), 245-256. DOI:10.1590/S0104-66322013000200003
219. Lee, G., Saito, I. (1998) Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. Gene. **216**(1), 55-65. DOI: 10.1016/S0378-1119(98)00325-4
220. Turan, S., Kuehle, J., Schambach, A., Baum, C., Bode, J. (2010) Multiplexing RMCE: versatile extensions of the Flp-recombinase-mediated cassette-exchange technology. Journal of molecular biology, **402**(1), 52-69. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.07.015
221. Turan, S., Galla, M., Ernst, E., Qiao, J., Voelkel, C., Schiedlmeier, B., Zehe, C., Bode, J. (2011) Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): traditional concepts and current challenges. Journal of molecular biology, **407**(2), 193-221. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.01.004
222. Wang, Y., Yau, Y., Perkins-Balding, D., Thomson, J. (2011) Recombinase technology: applications and possibilities. Plant cell reports, **30**(3), 267-285. DOI: 10.1007/s00299-010-0938-1
223. Schalk, A.M., Nguyen H.A., Rigouin, C., Lavie, A. (2014) Identification and Structural Analysis of an L-Asparaginase Enzyme from Guinea Pig with Putative Tumor Cell Killing Properties. Journal of Biological Chemistry, **289**(48), 33175-33186. DOI: 10.1074/jbc.M114.609552
224. Sajed, M., Falak, S., Muhammad, M.A., Ahmad, N., Rashid, N. (2022). A plant-type L-asparaginase from *Pyrobaculum calidifontis* undergoes temperature dependent autocleavage. Biologia, **77**(12), 1-9. DOI: 10.1007/s11756-022-01215-3
225. Jia, M., Xu, M., He, B., Rao, Z. (2013) Cloning, expression, and characterization of L-asparaginase from a newly isolated *Bacillus subtilis* B11-06. Journal of agricultural and food chemistry, **61**(39), 9428-9434. DOI: 10.1021/jf402636w
226. Urnov, F.D., Rebar, E.J., Holmes, M.C., Zhang, H.S., Gregory, P.D. (2010) Genome editing with engineered zinc finger nucleases. Nature reviews. Genetics, **11**(9), 636-646. DOI: 10.1038/nrg2842
227. Carroll, D. (2011) Genome engineering with zinc-finger nucleases. Genetics, **188**(4), 773-782. DOI: 10.1534/genetics.111.131433
228. Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., Voytas, D.F. (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. Genetics, **186**(2), 757-761. DOI: 10.1534/genetics.110.120717
229. Christian, M., Voytas, D.F. (2015). Engineered TAL effector proteins: versatile reagents for manipulating plant genomes. In Advances in new technology for targeted modification of plant genomes. (Zhang, F., Puchta, H., Thomson, J. eds) New York, NY, pp. 55-72. DOI: 10.1007/978-1-4939-2556-8_4
230. Sun, N., Zhao, H. (2013) Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. Biotechnology and bioengineering, **110**(7), 1811-1821. DOI: 10.1002/bit.24890
231. Alba Burbano, D., Cardiff, R.A.L., Tickman, B.I., Kiattisewee, C., Maranas, C.J., Zalatan, J.G., Carothers, J.M. (2023) Engineering activatable promoters for scalable and multi-input CRISPRa/i circuits. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **120**(30), e2220358120. DOI: 10.1073/pnas.2220358120
232. Makarova, K.S., Haft, D.J., Barrangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J., Wolf, Y.I., Yakunin, A.F., van der Oost, J., Koonin, E.V. (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nature reviews. Microbiology, **9**(6), 467-477. DOI: 10.1038/nrmicro2577
233. Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., Zhang, F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, **339**(6121), 819-823. DOI: 10.1126/science.1231143
234. Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., Zhang, F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nature protocols, **8**(11), 2281-2308. DOI: 10.1038/nprot.2013.143
235. Hsu, P.D., Lander, E.S., Zhang, F. (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell, **157**(6), 1262-1278. DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.010
236. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science, **337**(6096), 816-821. DOI: 10.1126/science.1225829
237. Brazelton, V.A., Jr, Zarecor, S., Wright, D.A., Wang, Y., Liu, J., Chen, K., Yang, B., Lawrence-Dill, C.J. (2015) A quick guide to CRISPR sgRNA design tools. GM crops food, **6**(4), 266-276. DOI: 10.1080/21645698.2015.1137690
238. Sahel, D.K., Vora, L.K., Saraswat, A., Sharma, S., Monpara, J., D'Souza, A.A., Mishra, D., Tryphena, K.P., Kawakita, S., Khan, S., Azhar, M., Khatri, D.K., Patel, K., Singh Thakur, R.R. (2023) CRISPR/Cas9 Genome Editing for Tissue-Specific *In Vivo* Targeting: Nanomaterials and Translational Perspective. Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany), **10**(19), e2207512. DOI: 10.1002/adv.202207512
239. Bannikov, A.V., Lavrov, A.V. (2017) CRISPR/CAS9, the King of Genome Editing Tools. Molekuliarnaia biologiya, (Mosk). **51**(4), 582-594. DOI: 10.7868/S0026898417040036
240. Fontana, J., Sparkman-Yager, D., Zalatan, J.G., Carothers, J.M. (2020) Challenges and opportunities with CRISPR activation in bacteria for data-driven metabolic engineering. Current opinion in biotechnology, **64**, 190-198. DOI: 10.1016/j.copbio.2020.04.005
241. Costa, I. M., Effer, B., Costa-Silva, T. A., Chen, C., Ciccone, M. F., Pessoa, A., Dos Santos, C. O., Monteiro, G. (2023). Cathepsin B Is Not an Intrinsic Factor Related to Asparaginase Resistance of the Acute Lymphoblastic Leukemia REH Cell Line. International journal of molecular sciences, **24**(13), 11215. DOI: 10.3390/ijms241311215
242. Weningen, A., Hatzl, A.M., Schmid, C., Vogl, T., Glieder, A. (2016). Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Journal of Biotechnology, **235**, 139-149. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.03.027
243. Gu, Y., Xu, X., Wu, Y., Niu, T., Liu, Y., Li, J., Du, G., Liu, L. (2018) Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: From rational design to industrial applications. Metabolic engineering, **50**, 109-121. DOI: 10.1016/j.mben.2018.05.006
244. Gao, J., Jiang, L., Lian, J. (2021) Development of synthetic biology tools to engineer *Pichia pastoris* as a chassis for the production of natural products. Synthetic and systems biotechnology, **6**(2), 110-119. DOI: 10.1016/j.synbio.2021.04.005
245. Thor, D., Xiong, S., Orazem, C.C., Kwan, A.C., Cregg, J.M., Lin-Cereghino, J., Lin-Cereghino, G.P. (2005) Cloning and characterization of the *Pichia pastoris* MET2 gene as a selectable marker. FEMS yeast research, **5**(10), 935-942. DOI: 10.1016/j.femsyr.2005.03.009
246. Piva, L.C., Bentacur, M.O., Reis, V.C.B., De Marco, J.L., Moraes, L.M.P., Torres, F.A.G. (2017) Molecular strategies to increase the levels of heterologous transcripts in *Komagataella phaffii* for protein production. Bioengineered, **8**(5), 441-445. DOI: 10.1080/21655979.2017.1296613
247. Das, A. (1990) Overproduction of proteins in *Escherichia coli*: vectors, hosts, and strategies. Methods in enzymology, **182**, 93-112. DOI: 10.1016/0076-6879(90)82011-p
248. Balbas, P., Bolivar, F. (1990) Design and construction of expression plasmid vectors in *Escherichia coli*. Methods in enzymology, **185**, 14-37. DOI: 10.1016/0076-6879(90)85005-9
249. Brosius, J. (1992) Compilation of superlinker vectors. Methods in enzymology, **216**, 469-483. DOI: 10.1016/0076-6879(92)16043-j
250. MacFerrin, K.D., Chen, L., Terranova, M.P., Schreiber, S.L., Verdine, G.L. (1993) Overproduction of proteins using expression-cassette polymerase chain reaction. Methods in enzymology, **217**, 79-102. DOI: 10.1016/0076-6879(93)17057-c
251. Yansura, D.G., Henner, D.J. (1990) Use of *Escherichia coli* trp promoter for direct expression of proteins. Methods in enzymology, **185**, 54-60. DOI: 10.1016/0076-6879(90)85007-b
252. Anné, J., Economou, A., Bernaerts, K. (2017) Protein Secretion in Gram-Positive Bacteria: From Multiple Pathways to Biotechnology. Current topics in microbiology and immunology, **404**, 267-308. DOI: 10.1007/82_2016_49
253. Sambrook, J., Russell, D. (2012) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Vols 1,2 and 3 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2100 pp.
254. Walker J.M., Ralph Rapley (2000) Molecular biology and biotechnology. The royal society of chemistry, London. DOI :10.1039/9781847551498
255. Huang, L., Liu, Y., Sun, Y., Yan, Q., Jiang, Z. (2014) Biochemical characterization of a novel L-asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. Applied and environmental microbiology, **80**(5), 1561-1569. DOI: 10.1128/AEM.03523-13
256. Labes, M., Pühler, A., Simon, R. (1990) A new family of RSF1010-derived expression and lac-fusion broad-host-range vectors for gram-negative bacteria. Gene, **89**(1), 37-46. DOI: 10.1016/0378-1119(90)90203-4
257. Balbas, P., Soberon, X., Bolivar, F., Rodriguez, R.L. (1988). The plasmid, pBR322. Biotechnology, **10**, 5-41. DOI: 10.1016/b978-0-409-90042-2.50007-6
258. Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.G., Ilangovan, K., Suzara, V.V., Düzgüneş, N., Renugopalakrishnan, V. (2007) Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. Applied biochemistry and biotechnology, **142**(2), 105-124. DOI: 10.1007/s12010-007-0003-x

259. de Boer, H.A., Comstock, L.J., Vasser, M. (1983) The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **80**(1), 21-25. DOI: 10.1073/pnas.80.1.21
260. Hayat, S.M.G., Farahani, N., Golichenari, B., Sahebkar A.H. (2018) Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): What We Need to Know. Current pharmaceutical design, **24**(6), 718-725. DOI: 10.2174/1381612824666180131121940
261. San, K.Y., Bennett, G.N., Chou, C.H., Aristidou, A.A. (1994) An optimization study of a pH-inducible promoter system for high-level recombinant protein production in *Escherichia coli*. Annals of the New York academy of sciences, **721**, 268-276. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb47400.x
262. Chou, C.H., Aristidou, A.A., Meng, S.Y., Bennett, G.N., San, K.Y. (1995) Characterization of a pH-inducible promoter system for high-level expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Biotechnology and bioengineering, **47**(2), 186-192. DOI: 10.1002/bit.260470210
263. Tolentino, G.J., Meng, S.Y., Bennett, G.N., San, K.Y. (1992) A pH-regulated promoter for the expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Biotechnology letters, **14**, 157-162. DOI: 10.1007/BF01023351
264. Giladi, H., Goldenberg, D., Koby, S., Oppenheim, A.B. (1995) Enhanced activity of the bacteriophage lambda PL promoter at low temperature. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **92**(6), 2184-2188. DOI: 10.1073/pnas.92.6.2184
265. Tanabe, H., Goldstein, J., Yang, M., Inouye, M. (1992) Identification of the promoter region of the *Escherichia coli* major cold shock gene, cspA. Journal of bacteriology, **174**(12), 3867-3873. DOI: 10.1128/jb.174.12.3867-3873.1992
266. Oppenheim, A.B., Giladi, H., Goldenberg, D., S. Kobi, S., Azar, I. (1996) Vectors and transformed host cells for recombinant protein production at reduced temperatures. International patent application patent/US5726039A
267. Goldstein, M.A., Doi, R.H. (1995) Prokaryotic promoters in biotechnology. Biotechnology annual review, **1**, 105-128. DOI: 10.1016/s1387-2656(08)70049-8
268. Bentley, W.E., Mirjalili, N., Andersen, D.C., Davis, R.H., Kompala, D.S. (1990) Plasmid-encoded protein: the principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. Biotechnology and bioengineering, **35**(7), 668-681. DOI: 10.1002/bit.260350704
269. Minas, W., Bailey, J.E. (1995) Co-overexpression of prfF increases cell viability and enzyme yields in recombinant *Escherichia coli* expressing *Bacillus stearo* thermophilus alpha-amylase. Biotechnology progress, **11**(4), 403-411. DOI: 10.1021/bp00034a007
270. Chen, W., Kallio, P.T., Bailey, J.E. (1995) Process characterization of a novel cross-regulation system for cloned protein production in *Escherichia coli*. Biotechnology progress, **11**(4), 397-402. DOI: 10.1021/bp00034a006
271. Mertens, N., Remaut, E., Fiers, W. (1995) Tight transcriptional control mechanism ensures stable high-level expression from T7 promoter-based expression plasmids. Biotechnology (N Y), **13**(2), 175-179. DOI: 10.1038/nbt0295-175
272. Depicker, A., Montagu, M.V. (1997) Post-transcriptional gene silencing in plants. Current opinion in cell biology, **9**(3), 373-382. DOI: 10.1016/s0955-0674(97)80010-5
273. O'Connor, C.D., Timmis, K.N. (1987) Highly repressible expression system for cloning genes that specify potentially toxic proteins. Journal of bacteriology, **169**(10), 4457-4462. DOI: 10.1128/jb.169.10.4457-4462.1987
274. Brown, W.C., Campbell, J.L. (1993) A new cloning vector and expression strategy for genes encoding proteins toxic to *Escherichia coli*. Gene, **127**(1), 99-103. DOI: 10.1016/0378-1119(93)90622-a
275. Doherty, A.J., Connolly, B.A., Worrall, A.F. (1993) Overproduction of the toxic protein, bovine pancreatic DNaseI, in *Escherichia coli* using a tightly controlled T7-promoter-based vector. Gene, **136**(1-2), 337-340. DOI: 10.1016/0378-1119(93)90491-k
276. Suter-Crazzolara, C., Unsicker, K. (1995) Improved expression of toxic proteins in *E. coli*. Biotechniques, **19**(2), 202-204; ISSN: 0736-6205
277. Trudel, P., Provost, S., Massie, B., Chartrand, P., Wall, L. (1996) pGATA: a positive selection vector based on the toxicity of the transcription factor GATA-1 to bacteria. Biotechniques, **20**(4), 684-693. DOI: 10.2144/19962004684
278. Wülfing, C., Plückthun, A. (1993) A versatile and highly repressible *Escherichia coli* expression system based on invertible promoters: expression of a gene encoding a toxic product. Gene, **136**(1-2), 199-203. DOI: 10.1016/0378-1119(93)90464-e
279. Zeng, H., Yang, A. (2019) Quantification of proteomic and metabolic burdens predicts growth retardation and overflow metabolism in recombinant *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering, **116**(6):1484-95.
280. Guleria, R., Jain, P., Verma, M., Mukherjee K.J. Designing next generation recombinant protein expression platforms by modulating the cellular stress response in *Escherichia coli*. Microb Cell Fact **19**, 227 (2020). DOI: 10.1186/s12934-020-01488-w
281. Mahalik, S., Sharma, A. K., Jain, P., Mukherjee, K. J. (2017). Identifying genomic targets for protein over-expression by "omics" analysis of Quiescent *Escherichia coli* cultures. Microbial cell factories, **16** (1), 133. DOI: 10.1186/s12934-017-0744-3
282. Mahalik, S., Sharma, A., Das, D.R., Mittra, D., Mukherjee, K. J. (2022). Co-expressing leucine responsive regulatory protein (Lrp) enhances recombinant L-asparaginase-II production in *Escherichia coli*. Journal of biotechnology, **351**, 99-108. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2022.04.012
283. Sharma, A.K., Shukla, E., Janoti, D.S., Mukherjee, K.J., Shiloach, J. (2020) A novel knock out strategy to enhance recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Microbial cell factories, **19**(1), 148. DOI: 10.1186/s12934-020-01407-z
284. Laxa, M. (2017) Intron-mediated enhancement: a tool for heterologous gene expression in plants? Frontiers in plant science, **7**, 1977. DOI: 10.3389/fpls.2016.01977
285. Georgiou, G., Valax, P. (1996) Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. Current opinion in biotechnology, **7**(2), 190-197. DOI: 10.1016/s0958-1669(96)80012-7
286. Andrews, B., Adari, H., Hannig, G., Lahue, E., Gosselin, M., Martin, S., Ahmed, A., Ford, P.J., Hayman, E.G., Makrides, S.C. (1996) A tightly regulated high level expression vector that utilizes a thermosensitive lac repressor: production of the human T cell receptor V beta 5.3 in *Escherichia coli*. Gene, **182**(1-2), 101-109. DOI: 10.1016/s0378-1119(96)00523-9
287. Freundlich, M., Ramani, N., Mathew, E., Sirko, A., Tsui, P. (1992) The role of integration host factor in gene expression in *Escherichia coli*. Molecular microbiology, **6**(18), 2557-2563. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01432.x
288. Giladi, H., Koby, S., Gottesman, M.E., Oppenheim, A.B. (1992) Supercoiling, integration host factor, and a dual promoter system, participate in the control of the bacteriophage lambda pL promoter. Journal of molecular biology, **224**(4), 937-948. DOI: 10.1016/0022-2836(92)90461-r
289. Harms, E., Wehner, A., Jennings, M.P., Pugh, K.J., Beacham, I.R., Rohm, K.H. (1991) Construction of expression systems for *E. coli* asparaginase II and two-step purification of the recombinant enzyme from periplasmic extracts. Protein expression and purification, **2**, 144-150.
290. Khushoo, A., Pal, Y., Singh, B.N., Mukherjee, K.J. (2004) Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II. Protein expression and purification, **38**(1), 29-36. DOI: 10.1016/j.pep.2004.07.009
291. Galas, D.J., Eggert, M., Waterman, M.S. (1985) Rigorous pattern-recognition methods for DNA sequences. Analysis of promoter sequences from *Escherichia coli*. Journal of molecular biology, **186**(1), 117-128. DOI: 10.1016/0022-2836(85)90262-1
292. Du, F., Liu, Y.Q., Xu, Y.S., Fei, Du, Li, Z.J., Wang, Y.Z., Zhang, Z.X., Sun, X.M. (2021) Regulating the T7 RNA polymerase expression in *E. coli* BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. Microbial cell factories, **20**, 189. DOI: 10.1186/s12934-021-01680-6
293. Lissner, S., Margalit, H. (1993). Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. Nucleic acids research, **21**(7), 1507-1516. DOI: 10.1093/nar/21.7.1507
294. Chohan, S.M., Rashid, N. (2013) TK1656, a thermostable L-asparaginase from *Thermococcus kodakaraensis*, exhibiting highest ever reported enzyme activity. Journal of bioscience and bioengineering, **116**(4), 438-443. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.04.005
295. Remaut, E., Tsao, H., Fiers, W. (1983) Improved plasmid vectors with a thermoinducible expression and temperature-regulated runaway replication. Gene, **22**(1), 103-113. DOI: 10.1016/0378-1119(83)90069-0
296. Yang, J., Ruff, A. J., Hamer, S. N., Cheng, F., Schwaneberg, U. (2016). Screening through the PLICable promoter toolbox enhances protein production in *Escherichia coli*. Biotechnology journal, **11**(12), 1639-1647. DOI: 10.1002/biot.201600270
297. Mohammadzadeh, R., Karbalaee, M., Soleimanpour, S., Mosavat, A., Rezaee, S.A., Ghazvini, K., Farsiani, H. (2021) Practical methods for expression of recombinant protein in the *Pichia pastoris* system. Current protocols, **1**(6), e155. DOI: 10.1002/cpz1.155
298. Vogl, T. (2022) Engineering of promoters for gene expression in *Pichia pastoris*. Methods in molecular biology, **2513**, 153-177. DOI: 10.1007/978-1-0716-2399-2_10
299. Yang, J., Cai, H., Liu, J., Zeng, M., Chen, J., Cheng, Q., Zhang, L. (2018) Controlling AOX1 promoter strength in *Pichia pastoris* by manipulating poly (dA:dT) tracts. Scientific reports, **8**(1), 1401. DOI: 10.1038/s41598-018-19831-y
300. Özçelik, A., Yılmaz, S., Inan, M. (2019) *Pichia pastoris* Promoters.

- Methods in molecular biology, **1923**, 97-112.
DOI: 10.1007/978-1-4939-9024-5_3
301. Effer, B., Lima, G.M., Cabarca, S., Pessoa, A., Farias, J.G., Monteiro, G. (2019) L-asparaginase from *E. chrysanthemi* expressed in Glycoswitch®: effect of His-Tag fusion on the extracellular expression. Preparative biochemistry & biotechnology, **49**(7), 679-685. DOI: 10.1080/10826068.2019.1599396
302. Vogl, T., Kickenweiz, T., Pitzer, J., Sturmberger, L., Weninger, A., Biggs, B.W., Köhler, E.M., Baumschlager, A., Fischer, J.E., Hyden, P., Wagner, M., Baumann, M., Borth, N., Geier, M., Ajikumar, P.K., Glieder, A. (2018) Engineered bidirectional promoters enable rapid multi-gene co-expression optimization. Nature communications, **9**(1), 3589. DOI: 10.1038/s41467-018-07112-1
303. Tien Cuong, Nguyen, Nguyen, Trang, Tuyen, Do, Thi, Quyen, D.T. (2014). Expression, purification and evaluation of recombinant L-asparaginase in methylothrophic yeast *Pichia pastoris*. Journal of Vietnamese Environment **6**(3):288-292 DOI:10.13141/jve.vol6.no3.pp288-292
304. Yang, S., Du, G., Chen, J., Kang, Z. (2017) Characterization and application of endogenous phase-dependent promoters in *Bacillus subtilis*. Applied microbiology and biotechnology, **101**(10), 4151-4161. DOI: 10.1007/s00253-017-8142-7
305. Niu, J., Yan, R., Shen, J., Zhu, X., Meng, F., Lu, Z., Lu, F. (2022). Cis-element engineering promotes the expression of *Bacillus subtilis* type I L-asparaginase and its application in food. International Journal of Molecular Sciences, **23** (12), 6588. DOI: 10.3390/ijms23126588
306. Rao, Y., Cai, D., Wang, H., Xu, Y., Xiong, S., Gao, L., Xiong, M., Wang, Z., Chen, S., Ma, X. (2020) Construction and application of a dual promoter system for efficient protein production and metabolic pathway enhancement in *Bacillus licheniformis*. Journal of biotechnology, **312**, 1-10. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2020.02.015
307. Zhao, X., Xu, J., Tan, M., Zhen, J., Shu, W., Yang, S., Ma, Y., Zheng, H., Song, H. (2020) High copy number and highly stable *Escherichia coli*-*Bacillus subtilis* shuttle plasmids based on pWB980. Microbial Cell Factories, **19**(1), 25. DOI: 10.1186/s12934-020-1296-5
308. Schumann, W. (2007) Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. Advances in applied microbiology, **2**, 137-189. DOI: 10.1016/S0065-2164(07)62006-1
309. Erden-Karaoglan, F., Karaoglan, M. (2023) Improvement of recombinant L-asparaginase production in *Pichia pastoris*. 3 Biotech, **13**(5), 164. DOI: 10.1007/s13205-023-03600-4
310. McCarthy, J.E., Brimacombe, R. (1994) Prokaryotic translation: the interactive pathway leading to initiation. Trends in genetics, **10**(11), 402-407. DOI: 10.1016/0168-9525(94)90057-4
311. Ringquist, S., Shinedling, S., Barrick, D., Green, L., Binkley, J., Stormo, G.D., Gold, L. (1992) Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site. Molecular microbiology, **6**(9), 1219-1229. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01561.x
312. Kozak, M. (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. Gene, **234**(2), 187-208. DOI: 10.1016/S0378-1119(99)00210-3
313. de Smit, M.H., van Duin, J. (1994) Control of translation by mRNA secondary structure in *Escherichia coli*. A quantitative analysis of literature data. Journal of molecular biology, **244**(2), 144-150. DOI: 10.1006/jmbi.1994.1714
314. Shine, J., Dalgarno, L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **71**(4), 1342-1346. DOI: 10.1073/pnas.71.4.1342
315. Hüttenhofer, A., Noller, H.F. (1994) Footprinting mRNA-ribosome complexes with chemical probes. The EMBO journal, **13**(16), 3892-3901. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06700.x
316. Scherer, G.F., Walkinshaw, M.D., Arnott, S., Morré, D.J. (1980) The ribosome binding sites recognized by *E. coli* ribosomes have regions with signal character in both the leader and protein coding segments. Nucleic acids research, **8**(17), 3895-3907. DOI: 10.1093/nar/8.17.3895
317. Chen, H., Bjerknes, M., Kumar, R., Jay, E. (1994) Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs. Nucleic acids research, **22**(23), 4953-4957. DOI: 10.1093/nar/22.23.4953
318. Chen, H., Pomeroy-Cloney, L., Bjerknes, M., Tam, J., Jay, E. (1994) The influence of adenine-rich motifs in the 3' portion of the ribosome binding site on human IFN-gamma gene expression in *Escherichia coli*. Journal of molecular biology, **240**(1), 20-27. DOI: 10.1006/jmbi.1994.1414
319. Wilson, B.S., Kautz, C.R., Antelman, D.E. (1994) Increased protein expression through improved ribosome-binding sites obtained by library mutagenesis. Biotechniques, **17**(5), 944-953
320. Nishi, T., Itoh, S. (1986) Enhancement of transcriptional activity of the *Escherichia coli* trp promoter by upstream A + T-rich regions. Gene, **44**(1), 29-36. DOI: 10.1016/0378-1119(86)90039-9
321. Stanssens, P., Remaut, E., Fiers, W. (1985) Alterations upstream from the Shine-Dalgarno region and their effect on bacterial gene expression. Gene, **36**(3), 211-223. DOI: 10.1016/0378-1119(85)90176-3
322. Warburton, N., Boseley, P.G., Porter, A.G. (1983) Increased expression of a cloned gene by local mutagenesis of its promoter and ribosome binding site. Nucleic acids research, **11**(17), 5837-5854. DOI: 10.1093/nar/11.17.5837
323. Salis, H.M., Mirsky, E.A., Voigt, C.A. (2009) Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. Nature biotechnology, **27**(10), 946-950. DOI: 10.1038/nbt.1568
324. Zhu, M., Zhang, X., Wang, Z., Lin, W., Xu, M., Yang, T., Shao, M., Rao, Z. (2021) Molecular modification and highly efficient expression of L-asparaginase from *Rhizomucor miehei*. Chinese Journal of Biotechnology, **37**(9), 3242-3252. DOI: 10.13345/j.cjb.200759
325. Stormo, G.D., Schneider, T.D., Gold, L.M. (1982) Characterization of translational initiation sites in *E. coli*. Nucleic acids research, **10**(9), 2971-2996. DOI: 10.1093/nar/10.9.2971
326. Sprengart, M.L., Fuchs, E., Porter, A.G. (1996) The downstream box: an efficient and independent translation initiation signal in *Escherichia coli*. The EMBO journal, **15**(3), 665-674
327. de Smit, M.H., van Duin, J. (1990) Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **87**(19), 7668-7672. DOI: 10.1073/pnas.87.19.7668
328. Hall, M.N., Gabay, J., Débarbouillé, M., Schwartz, M. (1982) A role for mRNA secondary structure in the control of translation initiation. Nature, **295**(5850), 616-618. DOI: 10.1038/295616a0
329. Wikström, P.M., Lind, L.K., Berg, D.E., Björk, G.R. (1992) Importance of mRNA folding and start codon accessibility in the expression of genes in a ribosomal protein operon of *Escherichia coli*. Journal of molecular biology, **224**(4), 949-966. DOI: 10.1016/0022-2836(92)90462-s
330. Gross, G., Mielke, C., Hollatz, I., Blöcker, H., Frank, R. (1990) RNA primary sequence or secondary structure in the translational initiation region controls expression of two variant interferon-beta genes in *Escherichia coli*. The Journal of biological chemistry, **265**(29), 17627-17636. DOI:10.1016/S0021-9258(18)38210-3
331. Ramesh, V., De, A., Nagaraja, V. (1994) Engineering hyperexpression of bacteriophage Mu C protein by removal of secondary structure at the translation initiation region. Protein engineering, **7**(8), 1053-1057. DOI: 10.1093/protein/7.8.1053
332. Nora, L.C., Westmann, C.A., Martins-Santana, L., Alves, L.F., Monteiro, L.M.O., Guazzaroni, M.E., Silva-Rocha, R. (2019) The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. Microbial biotechnology, **12**(1), 125-147. DOI: 10.1111/1751-7915.13318
333. Rosenberg, M., Court, D. (1979) Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. Annual review of genetics, **13**, 319-353. DOI: 10.1146/annurev.ge.13.120179.001535
334. Sharp, P.M., Bulmer, M. (1988) Selective differences among translation termination codons. Gene, **63**(1), 141-145. DOI: 10.1016/0378-1119(88)90553-7
335. Poole, E.S., Brown, C.M., Tate, W.P. (1995) The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of in vivo translational termination in *Escherichia coli*. The EMBO journal, **14**(1), 151-158. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb06985.x
336. Tate, W.P., Brown, C.M. (1992) Translational termination: "stop" for protein synthesis or "pause" for regulation of gene expression. Biochemistry, **31**(9), 2443-2450. DOI: 10.1021/bi00124a001
337. Chamberlin, M.J. (1992) New models for the mechanism of transcription elongation and its regulation. Harvey lectures, **88**:1-21.
338. Platt, T. (1986) Transcription termination and the regulation of gene expression. Annual review of biochemistry, **55**, 339-372. DOI: 10.1146/annurev.bi.55.070186.002011
339. Richardson, J.P. (1993) Transcription termination. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, **28**(1), 1-30. DOI: 10.3109/10409239309082571
340. Richardson J.P., Greenblatt J.L. (1996) Control of RNA chain elongation and termination. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology (Neidhardt, F.ed.) Washington, DC, pp. 822-848
341. Jensen, K., Bonekamp, F., Scharff-Poulsen, Peter. (1986) Attenuation at nucleotide biosynthetic genes and amino acid biosynthetic operons of *Escherichia coli*. Trends in Biochemical Sciences, **11**(9), 362-365. DOI:10.1016/0968-0004(86)90204-5

342. Qayyum, M.Z., Dey, D., Sen, R. (2016) Transcription Elongation Factor NusA is a General Antagonist of Rho-dependent Termination in *Escherichia coli*. The Journal of biological chemistry, **291**(15), 8090-8108. DOI: 10.1074/jbc.M115.701268
343. Brosius, J., Ullrich, A., Raker, M.A., Gray, A., Dull, T.J., Gutell, R.R., Noller, H.F. (1981) Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the *rrnB* ribosomal RNA operon of *E. coli*. Plasmid, **6**(1), 112-118. DOI: 10.1016/0147-619x(81)90058-5
344. Condon, C., Squires, C., Squires, C.L. (1995) Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. Microbiological reviews, **59**(4), 623-645. DOI: 10.1128/mr.59.4.623-645.1995
345. Kane, J.F. (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Current opinion in biotechnology, **6**(5), 494-500. DOI: 10.1016/0958-1669(95)80082-4
346. Zhang, S.P., Zubay, G., Goldman, E. (1991) Low-usage codons in *Escherichia coli*, yeast, fruit fly and primates. Gene, **105**(1), 61-72. DOI: 10.1016/0378-1119(91)90514-c
347. Xu, Y., Liu, K., Han, Y., Xing, Y., Zhang, Y., Yang, Q., Zhou, M. (2021) Codon usage bias regulates gene expression and protein conformation in yeast expression system *P. pastoris*. Microbial Cell Factories, **20**(1), 91. DOI: 10.1186/s12934-021-01580-9
348. Gouy, M., Gautier, C. (1982) Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. Nucleic acids research, **10**(22), 7055-7074. DOI: 10.1093/nar/10.22.7055
349. Dana, A., Tuller, T. (2014) The effect of tRNA levels on decoding times of mRNA codons. Nucleic acids research, **42**(14), 9171-9181. DOI: 10.1093/nar/gku646
350. Sharp, P.M., Cowe, E., Higgins, D.G., Shields, D.C., Wolfe, K.H., Wright, F. (1988) Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity. Nucleic acids research, **16**(17), 8207-8211. DOI: 10.1093/nar/16.17.8207
351. Yu, C.H., Dang, Y., Zhou, Z., Wu, C., Zhao, F., Sachs, M.S., Liu, Y. (2015) Codon usage influences the local rate of translation elongation to regulate co-translational protein folding. Molecular cell, **59**(5), 744-754. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.07.018
352. Singha, T. K., Gulati, P., Mohanty, A., Khata, Y. P., Kapoor, R. K., Kumar, S. (2017). Efficient genetic approaches for improvement of plasmid based expression of recombinant protein in *Escherichia coli*: A review. Process Biochemistry, **55**, 17-31. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.01.026
353. Chen, G.T., Inouye, M. (1994) Role of the AGA/AGG codons, the rarest codons in global gene expression in *Escherichia coli*. Genes & development, **8**(21), 2641-2652. DOI: 10.1101/gad.8.21.2641
354. Chen, K.S., Peters, T.C., Walker, J.R. (1990) A minor arginine tRNA mutant limits translation preferentially of a protein dependent on the cognate codon. Journal of bacteriology, **172**(5), 2504-2510. DOI: 10.1128/jb.172.5.2504-2510.1990
355. Hernan, R.A., Hui, H.L., Andracki, M.E., Noble, R.W., Sligar, S.G., Walder, J.A., Walder, R.Y. (1992) Human hemoglobin expression in *Escherichia coli*: importance of optimal codon usage. Biochemistry, **31**(36), 8619-8628. DOI: 10.1021/bi00151a032
356. Ernst, J. F., Kawashima, E. (1988) Variations in codon usage are not correlated with heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. Journal of biotechnology, **7**(1), 1-9. DOI: 10.1016/0168-1656(88)90030-2
357. Lee, H.W., Joo, J.H., Kang, S.S., Song, J.B., Kwon, M.H., Han, D.S., Na, D.S. (1992) Expression of human interleukin-2 from native and synthetic genes in *E. coli*: No correlation between major codon bias and high level expression. Biotechnology Letters, **14**, 653-658. DOI: 10.1007/BF01021637
358. Gustafsson, C., Govindarajan, S., Minshull, J. (2004) Codon bias and heterologous protein expression. Trends in biotechnology, **22**(7), 346-353. DOI: 10.1016/j.tibtech.2004.04.006
359. Komar, A.A. (2016). The art of gene redesign and recombinant protein production: approaches and perspectives. In protein therapeutics. Topics in medicinal chemistry (Sauna, Z., Kimchi-Sarfaty, C. eds) Springer, Cham. **21** pp161-177. DOI: 10.1007/7355_2016_2
360. Wu, G., Zheng, Y., Qureshi, I., Zin, H.T., Beck, T., Bulka, B., Freeland, S.J. (2006) SGDB: a database of synthetic genes re-designed for optimizing protein over-expression. Nucleic acids research, **35**, D76-D79. DOI: 10.1093/nar/gkl648
361. Einsfeldt, K., Baptista, I.C., Pereira, J.C., Costa-Amaral, I.C., Costa, E.S., Ribeiro, M.C., Land, M.G., Alves, T.L., Larentis, A.L., Almeida, R.V. (2016) Recombinant L-asparaginase from *Zymomonas mobilis*: A potential new antileukemic agent produced in *Escherichia coli*. PLoS One., **11**(6), e0156692. DOI: 10.1371/journal.pone.0156692
362. Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J.M., Kim, I.W., Sauna, Z.E., Calcagno, A.M., Ambudkar, S.V., Gottesman, M.M. (2007) A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. Science, **315**(5811), 525-528. DOI: 10.1126/science.1135308
363. Komar, A.A. (2009) A pause for thought along the co-translational folding pathway. Trends in biochemical sciences, **34**(1), 16-24. DOI: 10.1016/j.tibs.2008.10.002
364. Kim, S.J., Yoon, J.S., Shishido, H., Yang, Z., Rooney, L.A., Barral, J.M., Skach, W.R. (2015) Protein folding. Translational tuning optimizes nascent protein folding in cells. Science, **348**(6233), 444-448. DOI: 10.1126/science.aaa3974
365. Buhr, F., Jha, S., Thommen, M., Mittelstaet, J., Kutz, F., Schwalbe, H., Rodnina, M.V., Komar, A.A. (2016) Synonymous Codons Direct Cotranslational Folding toward Different Protein Conformations. Molecular cell, **61**(3), 341-351. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.01.008
366. Goldman, E., Rosenberg, A.H., Zubay, G., Studier, F.W. (1995) Consecutive low-usage leucine codons block translation only when near the 5' end of a message in *Escherichia coli*. Journal of molecular biology, **245**(5), 467-473. DOI: 10.1006/jmbi.1994.0038
367. Bulmer, M. (1988) Codon usage and intragenic position. Journal of theoretical biology, **133**(1), 67-71. DOI: 10.1016/s0022-5193(88)80024-9
368. Chen, G.F., Inouye, T.M. (1990) Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes. Nucleic acids research, **18**(6), 1465-1473. DOI: 10.1093/nar/18.6.1465
369. Boer, H. A., Kastelein, R. A. (1986) Biased codon usage: an exploration of its role in optimization of translation. In Biotechnology Series. pp. 225-285.
370. Eyre-Walker, A., Bulmer, M. (1993) Reduced synonymous substitution rate at the start of enterobacterial genes. Nucleic acids research, **21**(19), 4599-4603. DOI: 10.1093/nar/21.19.4599
371. Irwin, B., Heck, J.D., Hatfield, G.W. (1995) Codon pair utilization biases influence translational elongation step times. The Journal of biological chemistry, **270**(39), 22801-22806. DOI: 10.1074/jbc.270.39.22801
372. Rosenberg, A.H., Goldman, E., Dunn, J.J., Studier, F.W., Zubay, G. (1993) Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system. Journal of bacteriology, **175**(3), 716-722. DOI: 10.1128/jb.175.3.716-722.1993
373. Saier, M.H. Jr. (1995) Differential codon usage: a safeguard against inappropriate expression of specialized genes? FEBS letters, **362**(1), 1-4. DOI: 10.1016/0014-5793(95)00185-c
374. Mortazavi, M., Torkzadeh-Mahani, M., Kargar, F., Nezafat N., Younes G. (2019) *In silico* analysis of codon usage and rare codon clusters in the halophilic bacteria L-asparaginase. Biologia, **75**(4), 151-160. DOI: 10.2478/s11756-019-00324-w
375. Hatfield, G.W., Hung, S.P., Baldi, P. (2003) Differential analysis of DNA microarray gene expression data. Molecular microbiology, **47**(4), 871-877. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03298.x
376. Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., Pachter, L. (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. Nature protocols, **7**(3), 562-578. DOI: 10.1038/nprot.2012.016
377. Ghosh, D., Chinnaiyan, A.M. (2002) Mixture modelling of gene expression data from microarray experiments. Bioinformatics, **18**(2), 275-886. DOI: 10.1093/bioinformatics/18.2.275
378. Kerr, M.K., Churchill, G.A. (2001) Statistical design and the analysis of gene expression microarray data. Genet Res. **77**(2), 123-128. DOI: 10.1017/s0016672301005055
379. Mollah, M.M., Jamal, R., Mokhtar, N.M., Harun, R., Mollah, M.N. (2015) A Hybrid one-way ANOVA approach for the robust and efficient estimation of differential gene expression with multiple patterns. PLoS one, **10**(9), e0138810. DOI: 10.1371/journal.pone.0138810
380. Tarazona, S., Furió-Tari, P., Turrà, D., Pietro, A.D., Nueda, M.J., Ferrer, A., Conesa, A. (2015) Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. Nucleic acids research, **43**(21), e140. DOI: 10.1093/nar/gkv711
381. Ross, J. (1995) mRNA stability in mammalian cells. Microbiological reviews, **59**(3), 423-450. DOI: 10.1128/mr.59.3.423-450.1995
382. Brenner, S., Jacob, F., Meselson, M. (1961) An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. Nature, **190**, 576-581. DOI: 10.1038/190576a0
383. Ehretsmann, C.P., Carpousis, A.J., Krisch, H.M. (1992) mRNA

- degradation in procaryotes. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, **6**(13), 3186-3192. DOI: 10.1096/fasebj.6.13.1397840
384. Mugridge, J.S., Collier, J., Gross, J.D. (2018) Structural and molecular mechanisms for the control of eukaryotic 5'-3' mRNA decay. Nature structural & molecular biology, **25**(12), 1077-1085. DOI: 10.1038/s41594-018-0164-z
385. Nierlich, D.P., Murakawa, G.J. (1996) The decay of bacterial messenger RNA. Progress in nucleic acid research and molecular biology, **52**, 153-216. DOI: 10.1016/s0079-6603(08)60967-8
386. Petersen, C. (1992) Control of functional mRNA stability in bacteria: multiple mechanisms of nucleolytic and non-nucleolytic inactivation. Molecular microbiology, **6**(3), 277-282. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01469.x
387. Donovan, W.P., Kushner, S.R. (1986) Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *Escherichia coli* K-12. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **83**(1), 120-124. DOI: 10.1073/pnas.83.1.120
388. Har-El, R., Silberstein, A., Kuhn, J., Tal, M. (1979) Synthesis and degradation of lac mRNA in *E. coli* depleted of 30S ribosomal subunits. Molecular & general genetics, **173**(2), 135-144. DOI: 10.1007/BF00330303
389. Merino, E., Becerril, B., Valle, F., Bolivar, F. (1987) Deletion of a repetitive extragenic palindromic (REP) sequence downstream from the structural gene of *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase affects the stability of its mRNA. Gene, **58**(2-3), 305-309. DOI: 10.1016/0378-1119(87)90386-6
390. Newbury, S.F., Smith, N.H., Robinson, E.C., Hiles, I.D., Higgins, C.F. (1987) Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. Cell, **48**(2), 297-310. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90433-8
391. Chen, L.H., Emory, S.A., Bricker, A.L., Bouvet, P., Belasco, J.G. (1991) Structure and function of a bacterial mRNA stabilizer: analysis of the 5' untranslated region of ompA mRNA. Journal of bacteriology, **173**(15), 4578-4586. DOI: 10.1128/jb.173.15.4578-4586.1991
392. Emory, S.A., Belasco, J.G. (1990) The ompA 5' untranslated RNA segment functions in *Escherichia coli* as a growth-rate-regulated mRNA stabilizer whose activity is unrelated to translational efficiency. Journal of bacteriology, **172**(8), 4472-4481. DOI: 10.1128/jb.172.8.4472-4481.1990
393. Alifano, P., Bruni, C.B., Carlomagno, M.S. (1994) Control of mRNA processing and decay in prokaryotes. Genetica, **94**(2-3), 157-172. DOI: 10.1007/BF01443430
394. Nilsson, G., Belasco, J.G., Cohen, S.N., von Gabain, A. (1984) Growth-rate dependent regulation of mRNA stability in *Escherichia coli*. Nature, **312**(5989), 75-77. DOI: 10.1038/312075a0
395. Mohanty, B. K., Kushner, S. R. (2003). Genomic analysis in *Escherichia coli* demonstrates differential roles for polynucleotide phosphorylase and RNase II in mRNA abundance and decay. Molecular microbiology, **50**(2), 645-658. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03724.x
396. Fontes, A. M., Ito, J., Jacobs-Lorena, M. (1999). Control of messenger RNA stability during development. Current topics in developmental biology, **44**, 171-202. DOI: doi.org/10.1016/s0070-2153(08)60470-6
397. Duvoisin, R.M., Belin, D., Krisch, H.M. (1986) A plasmid expression vector that permits stabilization of both mRNAs and proteins encoded by the cloned genes. Gene, **45**(2), 193-201. DOI: 10.1016/0378-1119(86)90254-4
398. Gorski, K., Roch, J.M., Prentki, P., Krisch, H.M. (1985) The stability of bacteriophage T4 gene 32 mRNA: a 5' leader sequence that can stabilize mRNA transcripts. Cell, **43**(2 Pt 1), 461-469. DOI: 10.1016/0092-8674(85)90176-x
399. Bandrya, K., Luisi, B. (2013). mRNA Degradation in Prokaryotes. In Encyclopedia of Biophysics.(Roberts, G.C.K. ed.) Springer, Heidelberg. pp.1605-1611. DOI: 10.1007/978-3-642-16712-6_448
400. Wong, H.C., Chang, S. (1986) Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **83**(10), 3233-3237. DOI: 10.1073/pnas.83.10.3233
401. Belasco, J.G., Nilsson, G., von Gabain, A., Cohen, S.N. (1986) The stability of *E. coli* gene transcripts is dependent on determinants localized to specific mRNA segments. Cell, **46**(2), 245-251. DOI: 10.1016/0092-8674(86)90741-5
402. Belasco, J.G., Higgins, C.F. (1988) Mechanisms of mRNA decay in bacteria: a perspective. Gene, **72**(1-2), 15-23. DOI: 10.1016/0378-1119(88)90123-0
403. Chen, C.Y., Beatty, J.T., Cohen, S.N., Belasco, J.G. (1988) An intercistronic stem-loop structure functions as an mRNA decay terminator necessary but insufficient for puf mRNA stability. Cell, **52**(4), 609-619. DOI: 10.1016/0092-8674(88)90473-4
404. Guarneros, G., Montañez, C., Hernandez, T., Court, D. (1982) Posttranscriptional control of bacteriophage lambda gene expression from a site distal to the gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **79**(2), 238-242. DOI: 10.1073/pnas.79.2.238
405. Higgins, C.F., Causton, H.C., Dance, G.S.C., Mudd, E.A. (1993) The role of the 3' end in mRNA stability and decay. In Control of Messenger RNA Stability (J. Belasco, G. Brawerman Eds.) Academic Press, San Diego, CA, pp. 13-30. DOI: 10.1016/B978-0-08-091652-1.50006-2
406. Carzaniga, T., Sbaruffati, G., Briani, F. Gianni Dehò G. (2017). Polynucleotide phosphorylase is implicated in homologous recombination and DNA repair in *Escherichia coli*. BMC Microbiol **17** (81). DOI: 10.1186/s12866-017-0980-z
407. Goldberg, A.L., Goff, S.A. (1986) The selective degradation of abnormal proteins in bacteria. In Maximizing gene expression (W.Reznikoff, L.Gold eds) Butterworths, Boston, pp 287-314.
408. Gottesman, S. (1990) Minimizing proteolysis in *Escherichia coli*: genetic solutions. Methods in enzymology, **185**, 119-129. DOI: 10.1016/0076-6879(90)85013-e
409. Miller, C. G. 1996. Protein degradation and proteolytic modification, In *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology.(F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H. E. Umbarger ed.), ASM Press, Washington, D.C. p. 938-954.
410. Baneyx, F., Georgiou, G. (1992) Degradation of secreted proteins in *Escherichia coli*. Annals of the New York Academy of Sciences, **665**, 301-308. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1992.tb42593.x
411. Kaufmann, A., Stierhof, Y.D., Henning, U. (1994) New outer membrane-associated protease of *Escherichia coli* K-12. Journal of bacteriology, **176**(2), 359-367. DOI: 10.1128/jb.176.2.359-367.1994
412. Keiler, K.C., Waller, P.R., Sauer, R.T. (1996) Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. Science, **271**(5251), 990-993. DOI: 10.1126/science.271.5251.990
413. Baneyx, F., Georgiou, G. (1991) Construction and characterization of *Escherichia coli* strains deficient in multiple secreted proteases: protease III degrades high-molecular-weight substrates in vivo. Journal of bacteriology, **173**(8), 2696-2703. DOI: 10.1128/jb.173.8.2696-2703.1991
414. Baneyx, F., G. Georgiou. 1992 Expression of proteolytically sensitive polypeptides in *Escherichia coli*, In stability of protein pharmaceuticals. A chemical and physical pathways of protein degradation. (T.J. Ahern and M.C. Manning (ed.) Plenum Press, New York.pp. 69-108.
415. Murby, M., Uhlén, M., Ståhl, S. (1996) Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*. Protein expression and purification, **7**(2), 129-136. DOI: 10.1006/prep.1996.0018
416. Bachmair, A., Finley, D., Varshavsky, A. (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. Science, **234**(4773), 179-186. DOI: 10.1126/science.3018930
417. Bachmair, A., Varshavsky, A. (1989) The degradation signal in a short-lived protein. Cell, **56**(6), 1019-1032. DOI: 10.1016/0092-8674(89)90635-1
418. Gonda, D.K., Bachmair, A., Wüning, I., Tobias, J.W., Lane, W.S., Varshavsky, A. (1989) Universality and structure of the N-end rule. The Journal of biological chemistry, **264**(28), 16700-16712. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)84762-2
419. Tobias, J.W., Shrader, T.E., Rocap, G., Varshavsky, A. (1991) The N-end rule in bacteria. Science, **254**(5036), 1374-1337. DOI: 10.1126/science.1962196
420. Varshavsky, A. (1992) The N-end rule. Cell, **69**(5), 725-735. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90285-k
421. Rogers, S., Wells, R., Rechsteiner, M. (1990) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science, **234**(4774), 364-368. DOI: 10.1126/science.2876518
422. Murby, M., Samuelsson, E., Nguyen, T.N., Mignard, L., Power, U., Binz, H., Uhlén, M., Ståhl, S. (1995) Hydrophobicity engineering to increase solubility and stability of a recombinant protein from respiratory syncytial virus. European journal of biochemistry, **230**(1), 38-44. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20531.x
423. Hammarberg, B., Nygren, P.A., Holmgren, E., Elmlad, A., Tally, M., Hellman, U., Moks, T., Uhlén, M. (1989) Dual affinity fusion approach and its use to express recombinant human insulin-like growth factor II. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america, **86**(12), 4367-4371. DOI: 10.1073/pnas.86.12.4367
424. Hellebust, H., Murby, M., Abrahmsén, L., Uhle'n M., Enfors S.-O. (1989) Different approaches to stabilize a recombinant fusion protein. Nature biotechnology, **7**, 165-168. DOI: 10.1038/nbt0289-165
425. Carter, P. (1990) Site-specific proteolysis of fusion proteins. In: Protein Purification: From Molecular Mechanism to Large-Scale Processes. (R. Ladisch, R.C. Willson, C.C. Painton, S.E. Builder (Eds.). Symposium Series, **427**, American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 181-193.

426. Forsberg, G., Baastrup, B., Rondahl, H., Holmgren, E., Pohl, G., Hartmanis, M., Lake, M. (1992) An evaluation of different enzymatic cleavage methods for recombinant fusion proteins, applied on des(1-3)insulin-like growth factor I. *Journal of protein chemistry*, **11**(2), 201-211. DOI: 10.1007/BF01025226
427. Nilsson, B., Forsberg, G., Moks, T., Hartmanis, M., Uhlén, M. (1992). Fusion proteins in biotechnology and structural biology. *Current Opinion in Structural Biology*, **2**(4), 569-575. DOI: 10.1016/0959-440x(92)90087-n
428. Nygren, P.A., Ståhl, S., Uhlén, M. (1994) Engineering proteins to facilitate bioprocessing. *Trends in biotechnology*, **12**(5), 184-188. DOI: 10.1016/0167-7799(94)90080-9
429. Uhlén, M., Moks, T. (1990) Gene fusions for purpose of expression: an introduction. *Methods in enzymology*, **185**, 129-143. DOI: 10.1016/0076-6879(90)85014-f
430. Shen, S.H. (1984) Multiple joined genes prevent product degradation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **81**(15), 4627-4631. DOI: 10.1073/pnas.81.15.4627
431. Bowie, J.U., Sauer, R.T. (1989) Identification of C-terminal extensions that protect proteins from intracellular proteolysis. *The Journal of biological chemistry*, **264**(13), 7596-7602
432. Koken, M.H., Odijk, H.H., van Duin, M., Fornerod, M., Hoeijmakers, J.H. (1993) Augmentation of protein production by a combination of the T7 RNA polymerase system and ubiquitin fusion: overproduction of the human DNA repair protein, ERCC1, as a ubiquitin fusion protein in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*, **195**(2), 643-653. DOI: 10.1006/bbrc.1993.2094
433. Blondel, A., Nageotte, R., Bedouelle, H. (1996) Destabilizing interactions between the partners of a bifunctional fusion protein. *Protein engineering*, **9**(2), 2312-2318. DOI: 10.1093/protein/9.2.231
434. Patel, N., Krishnan, S., Offman, M.N., Krol, M., Moss, C.X., Leighton, C., van Delft, F.W., Holland, M., Liu, J., Alexander, S., Dempsey, C., Ariffin, H., Essink, M., Eden, T.O.B., Watts, C., Bates, P.A., Saha, V. (2009) A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug L-asparaginase. *Journal of Clinical. Investigation*, **119** (7), 1964–1973. DOI: 10.1172/JCI37977
435. Obukowicz, M.G., Staten, N.R., Krivi, G.G. (1992) Enhanced heterologous gene expression in novel rpoH mutants of *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, **58**(5), 1511-1523. DOI: 10.1128/aem.58.5.1511-1523.1992
436. Goldberg, A.L., Goff S.A., Casson L.P. (1988). Hosts and methods for producing recombinant products in high yields. WIPO (PCT) U.S. WO1985003949A1
437. Meerman, H.J., Georgiou, G. (1994) High-level production of proteolytically sensitive secreted proteins in *Escherichia coli* strains impaired in the heat-shock response. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **21**, 292-302. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb47402.x
438. Spiess, C., Beil, A., Ehrmann, M. (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell*, **97**(3), 339-347. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80743-6
439. Rizzitello, A.E., Harper, J.R., Silhavy, T.J. (2001) Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, **183**(23), 6794-6800. DOI: 10.1128/JB.183.23.6794-6800.2001
440. Safder, I., Khan, S., Islam, I., Ali MK, Bibi Z, Waqas M. (2018) *Pichia pastoris* Expression system: A potential candidate to express protein in industrial and biopharmaceutical domains. *Biomedical letters*, **4**(1), 1-14, DOI: v4i1-1-BML20171127
441. Hamed, M.B., Anné, J., Karamanou, S., Economou, A. (2018). *Streptomyces* protein secretion and its application in biotechnology. *FEMS microbiology letters*, **365**(22), fny250. DOI: 10.1093/femsle/fny250
442. Radha, R., Arumugam, N., Gummadi, S.N. (2018) Glutaminase free L-asparaginase from *Vibrio cholerae*: Heterologous expression, purification and biochemical characterization. *International journal of biological macromolecules*, **111**, 129-138. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.165
443. Coleman, R.J., Bruck, T. (2020) Method for production of recombinant erwinia asparaginase. US Patent No: 10,787,671 B2 Sep. 29
444. Simon, L.D., Randolph, B., Irwin, N., Binkowski, G. (1983) Stabilization of proteins by a bacteriophage T4 gene cloned in *Escherichia coli*. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, **80**(7), 2059-2062. DOI: 10.1073/pnas.80.7.2059
445. Singer, B.S., Gold, L. (1991) Phage T4 expression vector: protection from proteolysis. *Gene*, **106**(1), 1-6. DOI: 10.1016/0378-1119(91)90558-s
446. Lee, S.Y. (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in biotechnology*, **14**(3), 98-105. DOI: 10.1016/0167-7799(96)80930-9
447. Swamy, K.H., Goldberg, A.L. (1982) Subcellular distribution of various proteases in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, **149**(3), 1027-1033. DOI: 10.1128/jb.149.3.1027-1033.1982
448. Talmadge, K., Gilbert, W. (1982) Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America*, **79**(6), 1830-1833. DOI: 10.1073/pnas.79.6.1830
449. Fahey, R.C., Hunt, J.S., Windham, G.C. (1977) On the cysteine and cystine content of proteins. Differences between intracellular and extracellular proteins. *Journal of molecular evolution*, **10**(2), 155-160. DOI: 10.1007/BF01751808
450. Hwang, C., Sinskey, A.J., Lodish, H.F. (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*, **257**(5076), 1496-1502. DOI: 10.1126/science.1523409
451. Bardwell, J.C. (1994) Building bridges: disulphide bond formation in the cell. *Molecular microbiology*, **14**(2), 199-205. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb01281.x
452. Bardwell, J.C., McGovern, K., Beckwith, J. (1991) Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell*, **67**(3), 581-589. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90532-4
453. Guilhot, C., Jander, G., Martin, N.L., Beckwith, J. (1995) Evidence that the pathway of disulfide bond formation in *Escherichia coli* involves interactions between the cysteines of DsbB and DsbA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**(21), 9895-9899. DOI: 10.1073/pnas.92.21.9895
454. Pugsley, A.P. (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiological reviews*, **57**(1), 50-108. DOI: 10.1128/mr.57.1.50-108.1993
455. Stader, J.A., Silhavy, T.J. (1990) Engineering *Escherichia coli* to secrete heterologous gene products. *Methods in enzymology*, **185**, 166-187. DOI: 10.1016/0076-6879(90)85017-i
456. Petrovskaia, L.E., Ruzin, A.V., Shingarova, L.N., Korobko, V.G. (1995) Design of recombinant *Escherichia coli* strains, determining the secretory expression of artificial human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genes. *Bioorganicheskaya khimiya*, **21**(11), 845-854.
457. Georgiou, G., Segatori, L. (2005) Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Current opinion in biotechnology*, **16**(5), 538-545. DOI: 10.1016/j.copbio.2005.07.008
458. Hodgson, J. (1993) Expression systems: a user's guide. Emphasis has shifted from the vector construct to the host organism. *Biotechnology (N Y)*, **11**(8), 887-893. DOI: 10.1038/nbt0893-887
459. Blight, M.A., Chervaux, C., Holland, I.B. (1994) Protein secretion pathway in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology*, **5**(5), 468-474. DOI: 10.1016/0958-1669(94)90059-0
460. Saier, M.H. Jr, Werner, P.K., Müller, M. (1989) Insertion of proteins into bacterial membranes: mechanism, characteristics, and comparisons with the eucaryotic process. *Microbiological reviews*, **53**(3), 333-366. DOI: 10.1128/mr.53.3.333-366.1989
461. Pérez-Pérez, J., Márquez, G., Barbero, J.L., Gutiérrez, J. (1994) Increasing the efficiency of protein export in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)*, **12**(2), 178-180. DOI: 10.1038/nbt0294-178
462. Schatz, P.J., Beckwith, J. (1990) Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Annual review of genetics*, **24**, 215-248. DOI: 10.1146/annurev.ge.24.120190.001243
463. Schatz, G., Dobberstein, B. (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, **271**(5255), 1519-1526. DOI: 10.1126/science.271.5255.1519
464. von Heijne, G. (1990) The signal peptide. *The Journal of membrane biology*, **115**(3), 195-201. DOI: 10.1007/BF01868635
465. Kern, I., Ceglowski, P. (1995) Secretion of streptokinase fusion proteins from *Escherichia coli* cells through the hemolysin transporter. *Gene*, **163**(1), 53-57. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00395-m
466. Hoffman, C.S., Wright, A. (1985) Fusions of secreted proteins to alkaline phosphatase: an approach for studying protein secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**(15), 5107-5111. DOI: 10.1073/pnas.82.15.5107
467. Kadonaga, J.T., Gautier, A.E., Straus, D.R., Charles, A.D., Edge, M.D., Knowles, J.R. (1984) The role of the beta-lactamase signal sequence in the secretion of proteins by *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, **259**(4), 2149-2154. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)43329-1
468. Morioka-Fujimoto, K., Marumoto, R., Fukuda, T. (1991) Modified enterotoxin signal sequences increase secretion level of the recombinant human epidermal growth factor in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, **266**(3), 1728-1732
469. Abrahmsén, L., Moks, T., Nilsson, B., Uhlén, M. (1986) Secretion of heterologous gene products to the culture medium of *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, **14**(18), 7487-7500. DOI: 10.1093/nar/14.18.7487
470. Lo, A.C., MacKay, R.M., Seligy, V.L., Willick, G.E. (1988) *Bacillus subtilis*

- beta-1,4-endoglucanase products from intact and truncated genes are secreted into the extracellular medium by *Escherichia coli*. Applied and environmental microbiology, **54**(9), 2287-2292. DOI: 10.1128/aem.54.9.2287-2292.1988
471. Le Calvez, H., Green, J.M., Baty, D. (1996) Increased efficiency of alkaline phosphatase production levels in *Escherichia coli* using a degenerate PelB signal sequence. Gene, **170**(1), 51-55. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00850-0
472. Schein, C.H., Boix, E., Haugg, M., Holliger, K.P., Hemmi, S., Frank, G., Schwalbe, H. (1992) Secretion of mammalian ribonucleases from *Escherichia coli* using the signal sequence of murine spleen ribonuclease. The Biochemical journal, **283** (Pt 1), 137-144. DOI: 10.1042/bj2830137
473. Yari, M., Ghoshoon, M.B., Nezafat, N., Younes, G. (2020) Experimental evaluation of *in silico* selected signal peptides for secretory expression of *Erwinia* asparaginase in *Escherichia coli*. International journal of peptide research and therapeutics, **26**, 1583-1591. DOI: 10.1007/s10989-019-09961-w
474. Chan, W.K., Lorenzi, P.L., Anishkin, A., Purwaha, P., Rogers, D.M., Sukharev, S., Rempe, S.B., Weinstein, J.N. (2014) The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. Blood, **123**(23), 3596-3606. DOI: 10.1182/blood-2013-10-535112
475. Obukowicz, M.G., Turner, M.A., Wong, E.Y., Tacon, W.C. (1988) Secretion and export of IGF-1 in *Escherichia coli* strain JM101. Molecular & general genetics, **215**(1), 19-25. DOI: 10.1007/BF00331297
476. Hsiung, H., Cantrell, A., Luirink, J. B. Oudega, B., Veros, A. J., Becker, G. W. (1989) Use of bacteriocin release protein in *E. Coli* for excretion of human growth hormone into the culture medium. Nature biotechnology, **7**, 267-271. DOI: 10.1038/nbt0389-267
477. Aristidou, A.A., Yu, P., San, K.Y. (1993) Effects of glycine supplement on protein production and release in recombinant *Escherichia coli*. Biotechnology Letters, **15**, 331-336. DOI: 10.1007/BF00128271
478. Kobayashi, T., Kato, C., Kudo, T., Horikoshi, K. (1986) Excretion of the penicillinase of an alkalophilic *Bacillus* sp. through the *Escherichia coli* outer membrane is caused by insertional activation of the *kil* gene in plasmid pMB9. Journal of bacteriology, **166**(3), 728-732. DOI: 10.1128/jb.166.3.728-732.1986
479. Yu, P., Aristidou, A.A., San, K.Y. (1991) Synergistic effect of glycine and bacteriocin release protein in the release of periplasmic protein in recombinant *E. coli*. Biotechnology Letters, **13**, 311-316 (1991). DOI: 10.1007/BF01027674
480. Tsolis, K.C., Hamed, M.B., Simoons, K., Koepff, J., Busche, T., Rückert, C., Oldiges, M., Kalinowski, J., Anné, J., Kormanec, J., Bernaerts, K., Karamanou, S., Economou, A. (2019) Secretome dynamics in a gram-positive bacterial model. Molecular & cellular proteomics, **18**(3), 423-436. DOI: 10.1074/mcp.RA118.000899
481. Gwynne, D., Buxton, F., Williams, S., Garven S., Wayne Davies R. (1987) Genetically engineered secretion of active human interferon and a bacterial endoglucanase from *Aspergillus nidulans*. Nature biotechnology, **5**, 713-719. DOI: 10.1038/nbt0787-713
482. Freitas, M., Souza, P., Homem-de-Mello, M., Fonseca-Bazzo, Y.M., Silveira, D., Ferreira Filho E.X., Pessoa Junior, A., Sarker, D., Timson, D., Inácio, J., Magalhães, P.O. (2022) L-asparaginase from *Penicillium sizovae* produced by a recombinant *Komagataella phaffii* strain. Pharmaceuticals, **15**(6), 746-763. DOI: 10.3390/ph15060746
483. Schwarzhans, J. P., Luttermann, T., Geier, M., Kalinowski, J., Friehs, K. (2017). Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*. Biotechnology advances, **35**(6), 681-710. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.07.009
484. Hitzeman, R.A., Leung, D.W., Perry, L.J., Kohr, W.J., Levine, H.L., Goeddel, D.V. (1983) Secretion of human interferons by yeast. Science, **219**(4585), 620-625. DOI: 10.1126/science.6186023
485. Yang, Z., Zhang, Z. (2018) Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. Biotechnology advances, **36**(1), 182-195. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.11.002
486. Biasoto, H.P., Hebeda, C.B., Farsky, S.H.P., Pessoa, A., Costa-Silva, T.A., Monteiro, G. (2023) Extracellular expression of *Saccharomyces cerevisiae*'s L-asparaginase II in *Pichia pastoris* results in novel enzyme with better parameters. Preparative biochemistry & biotechnology, **53**(5), 511-522. DOI: 10.1080/10826068.2022.2111582
487. Feng, Y., Liu, S., Jiao, Y., Wang, Y., Wang, M., Du, G. (2019) Gene cloning and expression of the L-asparaginase from *Bacillus cereus* BDRD-ST26 in *Bacillus subtilis* WB600. Journal of bioscience and bioengineering, **127**(4), 418-424. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.09.007
488. Kim, S.K., Min, W.K., Park, Y.C., Seo, J.H. (2015) Application of repeated aspartate tags to improving extracellular production of *Escherichia coli* L-asparaginase isozyme II. Enzyme and microbial technology, **79-80**, 49-54. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2015.06.017
489. Caetano, L. F. (2020). Production and characterization of mutants of lower immunogenic potential of L-asparaginase II from *Escherichia coli*: Combination of *in silico* and *in vitro* studies, in postgraduate program in pharmacology. Universidade Federal Do Ceará: Available at: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/55993>
490. Butt, T.R., Jonnalagadda, S., Monia, B.P., Sternberg, E.J., Marsh, J.A., Stadel, J.M., Ecker, D.J., Crooke, S.T. (1989) Ubiquitin fusion augments the yield of cloned gene products in *Escherichia coli*. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, **86**(8), 2540-2544. DOI: 10.1073/pnas.86.8.2540
491. Baker, R.T., Smith, S.A., Marano, R., McKee, J., Board, P.G. (1994) Protein expression using cotranslational fusion and cleavage of ubiquitin. Mutagenesis of the glutathione-binding site of human Pi class glutathione S-transferase. The Journal of biological chemistry, **269**(41), 25381-25386. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)47260-2
492. Paraskevopoulou, V., Falcone, F.H. (2018) Polyionic tags as enhancers of protein solubility in recombinant protein expression. Microorganisms, **6**(2), 47. DOI: 10.3390/microorganisms6020047
493. LaVallie, E.R., McCoy, J.M. (1995) Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. Current opinion in biotechnology, **6**(5), 501-506. DOI: 10.1016/0958-1669(95)80083-2
494. Uhlén, M., Forsberg, G., Moks, T., Hartmanis, M., Nilsson, B. (1992) Fusion proteins in biotechnology. Current opinion in biotechnology, **3**(4), 363-369. DOI: 10.1016/0958-1669(92)90164-e
495. Wall, J.G., Plückthun, A. (1995) Effects of overexpressing folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Current opinion in biotechnology, **6**(5), 507-516. DOI: 10.1016/0958-1669(95)80084-0
496. LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F., McCoy, J.M. (1993) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. Biotechnology (N Y), **11**(2), 187-193. DOI: 10.1038/nbt0293-187
497. Van Trimont, M., Schalk, A.M., De Visser, Y., Nguyen, H.A., Reunes, L., Vandemeulebroecke, K., Peeters, E., Su, Y., Lee, H., Lorenzi, P.L., Chan, W.K., Mondelaers, V., De Moerloose, B., Lammens, T., Goossens, S., Van Vlierberghe, P., Lavie, A. (2023) In vivo stabilization of a less toxic asparaginase variant leads to a durable antitumor response in acute leukemia. Haematologica, **108**(2), 409-419. DOI: 10.3324/haematol.2022.281390
498. Ryu, J., Yang, S.J., Son, B., Lee, H., Lee, J., Joo, J., Park, H.H., Park, T.H. (2022) Enhanced anti-cancer effect using MMP-responsive L-asparaginase fused with cell-penetrating 30Kc19 protein. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, **50**(1), 278-285. DOI: 10.1080/21691401.2022.2126851
499. Guo, L., Wang, J., Qian, S., Yan, X., Chen, R., Meng, G. (2000) Construction and structural modeling of a single-chain Fv-asparaginase fusion protein resistant to proteolysis. Biotechnology and bioengineering, **70**(4), 456-463. DOI: 10.1002/1097-0290(20001120)70:4<3.CO;2-5
500. Butt, T.R., Edavettal, S.C., Hall, J.P., Mattern, M.R. (2005) SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. Protein expression and purification, **43**(1), 1-9. DOI: 10.1016/j.pep.2005.03.016
501. Komolov A., Sannikova, E., Gorbunov, A., Gubaidullin, I., Plokhikh, K., Konstantinova, G., Bulushova, N., Kuchin, S., Kozlov, D. (2023) Synthesis of biologically active proteins as L6KD-SUMO fusions forming inclusion bodies in *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering, **121**(2), 535-550. DOI: 10.1002/bit.28587
502. Harper, S., Speicher, D.W. (2011) Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. Methods in molecular biology, **681**, 259-280. DOI: 10.1007/978-1-60761-913-0_14
503. Dieterich, D.C., Landwehr, M., Reissner, C., Smalla, K.H., Richter, K., Wolf, G., Böckers, T.M., Gundelfinger, E.D., Kreutz, M.R. (2003) Gliap-a novel untypical L-asparaginase localized to rat brain astrocytes. Journal of neurochemistry, **85**(5), 1117-1125. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2003.01766.x
504. Costa, S.J., Almeida, A., Castro, A., Domingues, L., Besir, H. (2013) The novel Fh8 and H fusion partners for soluble protein expression in *Escherichia coli*: a comparison with the traditional gene fusion technology. Applied microbiology and biotechnology, **97**(15), 6779-6791. DOI: 10.1007/s00253-012-4559-1
505. Naderi, M., Ghaderi, R., Khezri, J., Karkhane, A., Bambai, B. (2022) Crucial role of non-hydrophobic residues in H-region signal peptide on secretory production of L-asparaginase II in *Escherichia coli*. Biochemical and biophysical research communications, **636**, 105-111. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.10.029
506. Buchner, J. (1996) Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. FASEB journal : official publication of the federation of american societies for experimental biology, **10**(1), 10-19. DOI: 10.1096/fasebj.10.1.8566529
507. Clarke, A.R. (1996) Molecular chaperones in protein folding and

- translocation. Current opinion in structural biology, **6**(1), 43-50. DOI: 10.1016/S0959-440X(96)80093-5
508. Ellis, R.J., Hartl, F.U. (1996) Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function. FASEB journal: official publication of the Federation of American societies for experimental biology, **10**(1), 20-26. DOI: 10.1096/fasebj.10.1.8566542
509. Gilbert, H.F. (1994) Protein chaperones and protein folding. Current opinion in biotechnology, **5**(5), 534-539. DOI: 10.1016/0958-1669(94)90070-1
510. Martin, J., Hartl, F.U. (1994) Molecular chaperones in cellular protein folding. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, **16**(9), 689-692. DOI: 10.1002/bies.950160916
511. Balchin, D., Hayer-Hartl, M., Hartl, F.U. (2020) Recent advances in understanding catalysis of protein folding by molecular chaperones. FEBS letters, **594**(17), 2770-2781. DOI: 10.1002/1873-3468.13844
512. Fatima, K., Naqvi, F., Younas, H. (2021) A Review: Molecular Chaperone-mediated folding, unfolding and disaggregation of expressed recombinant proteins. Cell biochemistry and biophysics, **79**(2), 153-174. DOI: 10.1007/s12013-021-00970-5
513. Goloubinoff, P., Gatenby, A.A., Lorimer, G.H. (1989) GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. Nature, **337**(6202), 44-47. DOI: 10.1038/337044a0
514. Hockney, R.C. (1994) Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. Trends in biotechnology, **12**(11), 456-463. DOI: 10.1016/0167-7799(94)90021-3
515. Lee, S.C., Olins, P.O. (1992) Effect of overproduction of heat shock chaperones GroESL and DnaK on human procollagenase production in *Escherichia coli*. The Journal of biological chemistry, **267**(5), 2849-2852. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)50659-7
516. Goliloo, E. B., Tollabi, M., Jaliani, H. Z. (2021) Soluble expression and purification of Q59L mutant L-asparaginase in the presence of chaperones in SHuffle™ T7 strain. International journal of medical laboratory, **8**(2), 6278. DOI: 10.18502/ijml.v8i2.6278
517. Lobstein, J., Emrich, C.A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., Berkmen, M. (2012) SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. Microb Cell Fact **11**, 753. DOI: 10.1186/1475-2859-11-56
518. Utami, D.F., Azizah, M.I., Sriwidodo, S., Haryanto, R.A., Pratiwi, R.D., Maksum, I. (2023) Review Article: Effect of co-expression chaperones on the expression of intracellular recombinant proteins in *Escherichia coli*. Chimica et natura acta, **11**(2), 25-33. 10.24198/cna.v11.n2.46480
519. Caspers, P., Stieger, M., Burn, P. (1994) Overproduction of bacterial chaperones improves the solubility of recombinant protein tyrosine kinases in *Escherichia coli*. Cellular and molecular biology (Noisy-le-grand), **40**(5), 635-644.
520. Blum, P., Ory, J., Bauernfeind, J., Krška, J. (1992) Physiological consequences of DnaK and DnaJ overproduction in *Escherichia coli*. Journal of bacteriology, **174**(22), 7436-7444. DOI: 10.1128/jb.174.22.7436-7444.1992
521. Sato, K., Sato, M.H., Yamaguchi, A., Yoshida, M. (1994) Tetracycline/H⁺ antiporter was degraded rapidly in *Escherichia coli* cells when truncated at last transmembrane helix and this degradation was protected by overproduced GroEL/ES. Biochemical and biophysical research communications, **202**(1), 258-264. DOI: 10.1006/bbrc.1994.1921
522. Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M.K., Hartl, F.U. (1992) Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. Nature, **356**(6371), 683-689. DOI: 10.1038/356683a0
523. Seyed Hosseini, Fin. N.A., Barshan-Tashnizi, M., Sajjadi, S.M., Asgari, S., Mohajerani, N., Mirzahoseini, H. (2019) The effects of overexpression of cytoplasmic chaperones on secretory production of hirudin-PA in *E. coli*. Protein expression and purification, **157**, 42-49. DOI: 10.1016/j.pep.2019.01.011
524. Humphreys, D.P., Weir, N., Mountain, A., Lund, P.A. (1995) Human protein disulfide isomerase functionally complements a dsbA mutation and enhances the yield of pectate lyase C in *Escherichia coli*. The Journal of biological chemistry, **270**(47), 28210-28215. DOI: 10.1074/jbc.270.47.28210
525. Ostermeier, M., De Sutter, K., Georgiou, G. (1996) Eukaryotic protein disulfide isomerase complements *Escherichia coli* dsbA mutants and increases the yield of a heterologous secreted protein with disulfide bonds. The Journal of biological chemistry, **271**(18), 10616-10622. DOI: 10.1074/jbc.271.18.10616
526. Cole, P.A. (1996) Chaperone-assisted protein expression. Structure, **4**(3), 239-242. DOI: 10.1016/S0969-2126(96)00028-7
527. Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Maekawa, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T., Ishii, S. (1995) Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. The Journal of biological chemistry, **270**(43), 25328-25331. DOI: 10.1074/jbc.270.43.25328
528. Jena, R., Garg, D.K., Choudhury, L., Saini, A., Kundu, B. (2018) Heterologous expression of an engineered protein domain acts as chaperone and enhances thermotolerance of *Escherichia coli*. International journal of biological macromolecules, **107**(Pt B), 2086-2093. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.081
529. Wang, Z., Zhang, M., Lv, X., Fan, J., Zhang, J., Sun, J., Shen, Y. (2018) GroEL/ES mediated the in vivo recovery of TRAIL inclusion bodies in *Escherichia coli*. Scientific reports, **8**(1), 15766. DOI: 10.1038/s41598-018-34090-7
530. Rudolph, R., Lilie, H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, **10**(1), 49-56. DOI: 10.1096/fasebj.10.1.8566547
531. Schein, C.H. (1991) Optimizing protein folding to the native state in bacteria. Current opinion in biotechnology, **2**(5), 746-750. DOI: 10.1016/0958-1669(91)90046-8
532. Schein, C.H. (1993) Solubility and secretability. Current opinion in biotechnology, **4**(4), 456-461. DOI: 10.1016/0958-1669(93)90012-1
533. Ki, M.R., Pack, S.P. (2020) Fusion tags to enhance heterologous protein expression. Applied microbiology and biotechnology, **104**(6), 2411-2425. DOI: 10.1007/s00253-020-10402-8
534. Proba, K., Ge, L., Plückthun, A. (1995) Functional antibody single-chain fragments from the cytoplasm of *Escherichia coli*: influence of thioredoxin reductase (TrxB). Gene, **159**(2), 203-207. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00018-2
535. Sørensen, H.P., Mortensen, K.K. (2005) Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. Microbial Cell Factories, **4**(1), 1. DOI: 10.1186/1475-2859-4-1
536. Dale, G.E., Broger, C., Langen, H., D'Arcy, A., Stüber, D. (1994) Improving protein solubility through rationally designed amino acid replacements: solubilization of the trimethoprim-resistant type S1 dihydrofolate reductase. Protein engineering, **7**(7), 933-939. DOI: 10.1093/protein/7.7.933
537. Rinas, U., Tsai, L.B., Lyons, D., Fox, G.M., Stearns, G., Fieschko, J., Fenton, D., Bailey, J.E. (1992) Cysteine to serine substitutions in basic fibroblast growth factor: effect on inclusion body formation and proteolytic susceptibility during in vitro refolding. Biotechnology (N Y), **10**(4), 435-440. DOI: 10.1038/nbt0492-435
538. Amrein, K.E., Takacs, B., Stieger, M., Molnos, J., Flint, N.A., Burn, P. (1995) Purification and characterization of recombinant human p50csk protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **92**(4), 1048-1052. DOI: 10.1073/pnas.92.4.1048
539. Cabilly, S. (1989) Growth at sub-optimal temperatures allows the production of functional, antigen-binding Fab fragments in *Escherichia coli*. Gene, **85**(2), 553-557. DOI: 10.1016/0378-1119(89)90451-4
540. Shirano, Y., Shibata, D. (1990) Low temperature cultivation of *Escherichia coli* carrying a rice lipoxigenase L-2 cDNA produces a soluble and active enzyme at a high level. FEBS letters, **271**(1-2), 128-130. DOI: 10.1016/0014-5793(90)80388-y
541. Blackwell, J.R., Horgan, R. (1991) A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. FEBS letters, **295**(1-3), 10-12. DOI: 10.1016/0014-5793(91)81372-f
542. Bowden, G. A., Georgiou, G. (1988). The effect of sugars on β -lactamase aggregation in *Escherichia coli*. Biotechnology progress, **4**(2), 97-101. DOI: 10.1002/BTPR.5420040208
543. Sugimoto, S., Yokoo, Y., Hatakeyama, N., Yotsuji, A., Teshiba, S., Hagino, H. (1991) Higher culture pH is preferable for inclusion body formation of recombinant salmon growth hormone in *Escherichia coli*. Biotechnology Letters, **13**, 385-388. DOI: 10.1007/BF01030987
544. Umetsu, M., Tsumoto, K., Ashish, K., Nitta, S., Tanaka, Y., Adschiri, T., Kumagai, I. (2004) Structural characteristics and refolding of in vivo aggregated hyperthermophilic archaeon proteins. FEBS letters, **557**(1-3), 49-56. DOI: 10.1016/S0014-5793(03)01441-8
545. Ventura, S., Villaverde, A. (2006). Protein quality in bacteria inclusion bodies. Trends in biotechnology, **24**(4), 179-185. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.02.007
546. Peternel, S., Komel, R. (2010). Isolation of biologically active nanomaterial (inclusion bodies) from bacterial cells. Microbial Cell Factories, **9**(1), 66. DOI: 10.1186/1475-2859-9-66
547. Peternel, S., Komel, R. (2011) Active protein aggregates produced in *Escherichia coli*. International Journal of Molecular Sciences, **12**(11), 8275-8287. DOI: 10.3390/ijms12118275
548. Vallejo, L.F., Rinas, U. (2004) Strategies for the recovery of active proteins

- through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, **3**(1), 11. DOI: 10.1186/1475-2859-3-11
549. Kante, R.K., Vemula, S., Somavarapu, S., Mallu, M.R., Boje Gowd, B.H., Ronda, S.R. (2018) Optimized upstream and downstream process conditions for the improved production of recombinant human asparaginase (rhASP) from *Escherichia coli* and its characterization. *Biologicals*, **56**, 45-53. DOI: 10.1016/j.biologics.2018.10.002
550. Singhvi, P., Verma, J., Panwar, N., Wani, T.Q., Singh, A., Qudratullah, M., Chakraborty, A., Saneja, A., Sarkar, D.P., Panda, A.K. (2021) Molecular attributes associated with refolding of inclusion body proteins using the freeze-thaw method. *Frontiers in Microbiology*, **12**, 618559. DOI: 10.3389/fmicb.2021.618559
551. Rajendran, V., Pushpavanam, S., Jayaraman, G. (2022) Continuous refolding of L-asparaginase inclusion bodies using periodic counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A.*, **1662**(901), 462746. DOI: 10.1016/j.chroma.2021.462746
552. Clark, E.D. (2001) Protein refolding for industrial processes. *Current opinion in biotechnology*, **12**(2), 202-207. DOI: 10.1016/S0958-1669(00)00200-7
553. Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A.K., Singh, S.M., Panda, A.K. (2015) Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, **14**(1), 41. DOI: 10.1186/s12934-015-0222-8
554. Singh, A., Upadhyay, V., Singh, A., Panda, A.K. (2022) Structure-function relationship of inclusion bodies of a multimeric protein. *Frontiers of Microbiology*, **8**(11), 876. doi: 10.3389/fmicb.2020.00876.
555. Yuan, T. Z., Ormonde, C., Kudlacek, S.T., Kunche, S., Smith, J.N., Brown, W.A., Pugliese, K.M., Olsen, T., Iftikhar, M., Raston, C., Weiss, G.A. (2015). Shear-stress-mediated refolding of proteins from aggregates and inclusion bodies. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, **16** (3), 393-396. DOI: 10.1002/cbic.201402427
556. Mukhopadhyay, A. (1997) Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, **56**, 61-109. DOI: 10.1007/BFb0103030
557. Burgess, R.R. (2009) Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods in enzymology*, **463**, 259-282. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63017-2
558. Ford, C.F., Suominen, I., Glatz, C.E. (1991) Fusion tails for the recovery and purification of recombinant proteins. *Protein expression and purification*, **2**(2-3), 95-107. DOI: 10.1016/1046-5928(91)90057-p
559. Yamané, T., Shimizu, S. (2006). Fed-batch techniques in microbial processes. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, **30**, 147-194. DOI: 10.1007/BFb0006382
560. Baeshen, M. N., Al-Hejin, A. M., Bora, R. S., Ahmed, M. M., Ramadan, H. A., Saini, K. S., Baeshen, N. A., Redwan, E. M. (2015). Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: Current scenario and future perspectives. *Journal of microbiology and biotechnology*, **25**(7), 953-962. DOI: 10.4014/jmb.1412.12079
561. Yee, L., Blanch, H.W. (1992) Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)*, **10**(12), 1550-1556. DOI: 10.1038/nbt1292-1550
562. Doriya, K., Jose, N., Gowda, M., Kumar, D.S. (2016) Solid-state fermentation vs submerged fermentation for the production of L-asparaginase. *Advances in food and nutrition research*, **78**:115-135. DOI: 10.1016/bs.afnr.2016.05.003
563. Luli, G.W., Strohl, W.R. (1990) Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Applied and environmental microbiology*, **56**(4), 1004-1011. DOI: 10.1128/aem.56.4.1004-1011.1990
564. Aristidou, A.A., San, K.Y., Bennett, G.N. (1995) Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance recombinant protein production through acetate reduction. *Biotechnology progress*, **11**(4), 475-478. DOI: 10.1021/bp00034a019
565. San, K.Y., Bennett, G.N., Aristidou, A.A., Chou, C.H. (1994) Strategies in high-level expression of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Annals of the New York academy of sciences*, **721**, 257-267. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb47399.x
566. Jacques, N., Guillerez, J., Dreyfus, M. (1992) Culture conditions differentially affect the translation of individual *Escherichia coli* mRNAs. *Journal of molecular biology*, **226**(3), 597-608. DOI: 10.1016/0022-2836(92)90618-t
567. Hymavathi, M., Sathish, T., Subba Rao, Ch., Prakasham, R.S. (2009) Enhancement of L-asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) using response surface methodology. *Applied biochemistry and biotechnology*, **159**(1), 191-198. DOI: 10.1007/s12010-008-8438-2
568. Mihooliya, K.N., Nandal, J., Kumari, A., Nanda, S., Verma, H., Sahoo, D.K. (2020) Studies on efficient production of a novel L-asparaginase by a newly isolated *Pseudomonas resinovorans* IGS-131 and its heterologous expression in *Escherichia coli*. *3 Biotechnology*, **10**(4), 148. DOI: 10.1007/s13205-020-2135-4
569. Kwon, S., Kim, S., Kim, E. (1996) Effects of glycerol of beta-lactamase production during high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology progress*, **12**(2), 205-208. DOI: 10.1021/bp9500728
570. Barros, T., Brumano, L., Freitas, M., Pessoa, A., Junior, Parachin, N., Magalhães, P.O. (2020) Development of processes for recombinant L-asparaginase II production by *Escherichia coli* B121 (De3): from shaker to bioreactors. *Pharmaceutics*, **13**(1), 14. DOI: 10.3390/pharmaceutics13010014
571. Ghoshon, M.B., Berenjian, A., Hemmati, S., Dabbagh, F., Karimi, Z., Negahdaripour, M., Ghasemi, Y. (2015) Extracellular production of recombinant L-asparaginase II in *Escherichia coli*: medium optimization using response surface methodology. *International journal of peptide research and therapeutics*, **21**(4), 487-495. DOI: 10.1007/s10989-015-9476-6
572. Ukkonen, K., Neubauer, A., Pereira, V.J., Vasala, A. (2017) High yield of recombinant protein in shaken *E. coli* cultures with enzymatic glucose release medium En Presso B. In heterologous gene expression in *E.coli*. *Methods in molecular biology* (Burgess-Brown, N. eds), Humana Press, New York, NY. **1586**, 127-137. DOI: 10.1007/978-1-4939-6887-9_8
573. Moorthy, V., Ramalingam, A., Alagarsamy, S., Shankaranaya, R. (2010) Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus sp.* *African journal of microbiology research bengaluru*, **4**(560), 1862-1867, <http://www.academicjournals.org/ajmr>
574. Thirunavukkarasu N., Suryanarayanan N.S., Murali T.S., Ravishankar J.A.P., Gummadi, S. (2011) L-asparaginase from marine derived fungal endophytes of seaweeds. *Mycosphere*, **2**(2), 147-155.
575. Ariga, O., Andoh, Y., Fujishita, Y., Watari, T., Sano, Y. (1991) Production of thermophilic α -amylase using immobilized transformed *Escherichia coli* by addition of glycine. *Journal of fermentation and bioengineering*, **71**(6), 397-402. DOI: 10.1016/0922-338X(91)90250-K
576. Ghosh, S., Murthy, S., Govindasamy, S., Chandrasekaran, M. (2013) Optimization of L-asparaginase production by *Serratia marcescens* (NCIM 2919) under solid state fermentation using coconut oil cake. *Sustainable chemical processes*, **1**(1), 9. DOI: 10.1186/2043-7129-1-9
577. Trang, T.H.N., Cuong, T.N., Thanh, S.L.N., Tuyen, T. D. (2016) Optimization, purification and characterization of recombinant L-asparaginase II in *Escherichia coli*. *African journal of biotechnology*, **15**(31), 1681-1691. DOI: 10.5897/AJB2016.15425
578. Borah, D., Yadav, R., Sangra, A., Shahin, L., Anand, A., Chaubey, K. (2012) Production, purification and process optimization of asparaginases (an anticancer enzyme) from *E. coli*, from sewage water. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, **4**(4), 560-563.
579. Muharram, M., Abulhamd A., Salem-Bekhet, M. (2014) Recombinant expression, purification of L-asparaginase-II from thermotolerant *E. Coli* strain and evaluation of its antiproliferative activity. *African journal of microbiology research*, **8**(15), 1610-1619. DOI: 10.5897/AJMR2014.6725
580. Vidya, J., Vasudevan, U.M., Soccol, C., Pandey, A. (2011) Cloning, functional expression and characterization of L-asparaginase II from *E. coli* MTCC 739. *Food technology and biotechnology*, **49**(3), 286-290. <https://hrcak.srce.hr/71053>. Accessed 27 May 2024
581. Baskar, G., Rajasekar, V., Renganathan, S. (2011) Modeling and Optimization of L-asparaginase production by *Enterobacter Aerogenes* Using Artificial Neural Network Linked Genetic Algorithm. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, **2**(2), 98-100. DOI: 10.7763/IJCEA.2011.V2.83
582. Goswami, R., Veeranki, V.D., Mishra, V.K. (2019) Optimization of process conditions and evaluation of pH & thermal stability of recombinant L-asparaginase II of *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica SCRI 1043 in *E. coli*. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, **22**(3), 101377. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101377
583. Ebrahimi, V., Hashemi, A. (2024) Optimizing recombinant production of L-asparaginase I from *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *Folia Microbiologica*, **69**(6), 1-15. DOI: 10.1007/s12223-024-01163-2
584. Çalık, P., Ata, O., Güneş, H., Massahi, A., Boy, E., Keskin, A., Öztürk, S., Zerze, G.H., Özdamar, T.H. (2015) Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: from carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. *Biochemical engineering journal*, **95**, 20-36. DOI: 10.1016/j.bej.2014.12.003
585. Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., Fotiadis, D., Kovar, K. (2015) Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology advances*, **33**(6 Pt 2), 1177-1193.

- DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.05.008
586. *Abribat, T.* (2023) Pegylated L-asparaginase. United States: Carpmals, Ransford LLP. Patent No. EP10730170.7
587. *Trieu, V.* (2010). Albumin binding peptide-mediated disease targeting. CA: Ridout and Maybee LLP. Patent No. 2867252
588. *Lavie, A., Nguyen, H.* (2017) L-asparaginase variants and FUSION proteins with reduced L-glutaminase activity and enhanced stability. WO. Patent No. US2017/020090
589. *Chahardahcherik, M., Ashrafi, M., Ghasemi, Y., Aminlari, M.* (2020) Effect of chemical modification with carboxymethyl dextran on kinetic and structural properties of L-asparaginase. *Analytical biochemistry*, **591**(6), 113537. DOI: 10.1016/j.ab.2019.113537
590. *Qian, G., Zhou, J., Ma, J., Wang, D., He, B.* (1996) The chemical modification of *E. coli* L-asparaginase by N,O-carboxymethyl chitosan. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*, **24**(6), 567-577. DOI: 10.3109/10731199609118882
591. *Sindhu, R., Pradeep, H., Manonmani, H.K.* (2019) Polyethylene glycol acts as a mechanistic stabilizer of L-asparaginase: A computational probing. *Medicinal chemistry (Sharīqah (United Arab Emirates))*, **15**(6), 705-714. DOI: 10.2174/1573406415666190206232816
592. *Cerofolini, L., Giuntini, S., Carlon, A., Ravera, E., Calderone, V., Fragai, M., Parigi, G., Luchinat, C.* (2019) Characterization of PEGylated asparaginase: new opportunities from NMR analysis of large PEGylated therapeutics. *Chemistry*, **25**(8), 1984-1991. DOI: 10.1002/chem.201804488
593. *Veronese, F.M., Pasut, G.* (2005) PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug discovery today*, **10**(21), 1451-1458. DOI: 10.1016/S1359-6446(05)03575-0
594. *MacDonald, T., Kulkarni, K., Bernstein, M., Fernandez, C.V.* (2016) Allergic reactions with intravenous compared with intramuscular pegaspargase in children with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a population-based study from the maritimes, Canada. *Journal of pediatric hematology/oncology*, **38**(5), 341-344. DOI: 10.1097/MPH.0000000000000520
595. *Dobryakova, N.D., Kudryashova, E.V.* (2023) Stabilization of *Erwinia carotovora* and *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginases in complexes with polycations. *Applied biochemistry and microbiology*, **59**(9), 1183-1191. DOI: 10.1134/S000368382309003X

Поступила: 01.01.2025
 После доработки: 30.10.2025
 Принята к публикации: 02.11.2025

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF RECOMBINANT L-ASPARAGINASE GENES[#]

M.V. Pokrovskaya, S.S. Alexandrova, V.S. Pokrovsky, N.D. Dobryakova, A.N. Shishparenok, Yu.V. Gladilina, D.D. Zhdanov*

Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121; *e-mail: Ivan1190@yandex.ru

L-asparaginase (EC 3.5.1.1.) is the enzyme with the highest level of global production and is used in the treatment of cancer and in the food industry. Different expression systems are used for the production of many target proteins, ranging from cell-free to hyperproductive plant, insect, bacterial and mammalian cells. This review attempts to bring together the available literature data on heterologous gene expression and technology for the production of recombinant L-asparaginases.

Key words: L-asparaginase; expression optimization; heterologous expression; rational and computer-aided design; recombinant genes

FUNDING

The work was carried out within the framework of the Program of Fundamental Scientific Research in the Russian Federation for the long-term period (2021-2030) (No. 122022800499-5).

Received: 01.01.2025, revised: 30.10.2025, accepted: 02.11.2025

[#]Dedicated to late Professor N.N. Sokolov, who made a significant contribution in the field of L-asparaginase