

УДК 577.15.08;577.152.34

Биосинтез и секреция сериновой пептидазы SerP38 *Tenebrio molitor* в дрожжах *Komagataella kurtzmanii*

© 2020 А.А. ГОРБУНОВ¹, Ф.И. АКЕНТЬЕВ², И.И. ГУБАЙДУЛЛИН^{1,2}, Н.И. ЖИГАНОВ³, В.Ф. ТЕРЕЩЕНКОВА⁴, Е.Н. ЭЛПИДИНА⁵, Д.Г. КОЗЛОВ^{*}

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 123182

² НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Курчатовский геномный центр, Москва, 117545

³ Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991

⁴ Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991

⁵ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991

*e-mail: Kozlov_DG@rck.ru

Поступила в печать 10.11.2020 г.

После доработки 16.11.2020 г.

Принята к публикации 11.12.2020 г.

Получен штамм дрожжей *Komagataella kurtzmanii* – продуцент рекомбинантной пептидазы SerP38 мучного хрущака *Tenebrio molitor*. Уровень секреции профермента составил 20–50 мг/л. Показано, что в процессе секреции в дрожжах целевой белок, содержащий His₆-tag, продуцировался в двух формах. Одна из них представлена мономером, который был очищен аффинной хроматографией на Ni-NTA-агарозе и затем активирован трипсином. Другая форма целевого белка накапливалась в культуральной жидкости в виде олигомеров, не активируемых трипсином и подверженных агрегации в присутствии ионов Ni²⁺, что, скорее всего, обусловлено неправильным сворачиванием полипептидной цепи.

Ключевые слова: *Tenebrio molitor*, сериновая пептидаза семейства S1, дрожжи, *Komagataella kurtzmanii*, ионзависимая агрегация

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-78-86

Пептидазы представляют собой ферменты класса гидролаз, способные осуществлять каталитическое расщепление белков. Существующее в природе многообразие белковых мишеней и мест их локализации находит отражение в изобиологии протеолитических ферментов, обладающих различными физико-химическими свойствами и продуцируемых всеми типами клеток любого живого организма.

Помимо выполнения жизнеобеспечивающих функций пептидазы находят широкое применение в промышленности. В частности, их используют при изготовлении моющих средств и переработке отходов, в пищевой и кожевенной

промышленности, в парфюмерии, медицине и других областях. Потребность в промышленном использовании пептидаз растет с каждым годом; при этом особый интерес вызывают ферменты, способные функционировать в экстремальных условиях.

Интерес к протеолитическому комплексу вредителя запасов зерновых продуктов – мучного хрущака *Tenebrio molitor*; жука из семейства Tenebrionidae, – связан с представлениями о том, что недостаток влаги в местах его обитания и, в значительной степени, безводная диета могли стимулировать развитие уникального пищеварительного комплекса насекомого и появление в его

Список сокращений: SerP38 – сериновая пептидаза 38 *Tenebrio molitor*; КЖ – культуральная жидкость.

составе ферментов, обладающих аномальными свойствами. В частности, нельзя исключить, что некоторые из присущих *T. molitor* ферментов способны эффективно функционировать при почти нулевой влажности – когда обычные гидролазы неактивны.

Личинки *T. molitor* являются удобной биохимической моделью для исследования широкого спектра протеолитических ферментов различной специфичности [1]. Большую группу пищеварительных пептидаз жуков составляют сериновые пептидазы, входящие в семейство химотрипсина S1 по классификации MEROPS [2]. Для них характерны высокие уровни экспрессии мРНК и высокая удельная активность [3–5]. Расшифровка генома модельного жука *Tribolium castaneum* из того же семейства Tenebrionidae позволила выявить в числе сериновых пептидаз семейства S1 ферменты с необычной структурой субстратсвязывающего субсайта S1, определяющего специфичность этих пептидаз [6]. Ранее в нашей лаборатории был получен обширный транскриптом из кишечника личинок *T. molitor* [7], анализ которого позволил выявить высокоэкспрессируемую пищеварительную пептидазу SerP38. S1-субстратсвязывающий субсайт SerP38 имеет структуру, ранее выявленную преимущественно у ферментов Членистоногих (Arthropoda), и соответствует редкому для сериновых пептидаз коллагенолитическому типу протеолитической активности [8]. Данное обстоятельство стимулировало интерес к разработке рекомбинантного штамма-производителя пептидазы SerP38 с целью изучения ее свойств и перспектив промышленного применения.

Ранее показано [9], что метилотрофные дрожжи *Komagataella kurtzmanii* могут осуществлять эффективный биосинтез и секрецию рекомбинантных ферментов, представляя собой основу системы экспрессии, альтернативной *K. phaffii* (ранее *Pichia pastoris*).

В цели работы входило конструирование штамма *K. kurtzmanii* – производителя рекомбинантной пептидазы SerP38 *T. molitor*, секретируемой во внеклеточную среду, а также разработка способа очистки фермента для дальнейших физико-химических исследований.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Конструирование плазмид и штаммов

Фрагмент ДНК, кодирующий пептидазу SerP38, получали с помощью ПЦР-амплификации. Матрицей для амплификации служила плазида р38-6 («Евроген», Россия), содержащая κДНК пептидазы SerP38 (GenBank MW249059). ПЦР

проводили с помощью ДНК-полимеразы Phusion (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием праймеров pNcoI (5'-tataccatggaaaagagatccccctc-gatgtggaccctt-3') и pSalI (5'-tttgcgacttaatggtgatg-gtgatgatggtgatattttggcgatcc-3'). Помимо сайтов рестрикции *NcoI* и *SalI* (подчеркнуты в составе соответствующих праймеров) в ходе ПЦР в состав амплифицированного фрагмента была введена последовательность ДНК, обеспечивавшая синтез профермента SerP38, содержавшего дополнительный С-концевой пептид, включавший 6 остатков гистидина (His₆-tag).

Амплифицированный фрагмент ДНК клонировали в вектор рРН727-АОХ727 [10] по сайтам рестрикции *NcoI/XhoI*. В результате клонирования получили плазмиду рРН727-SerP38, в составе которой фрагмент ДНК, кодирующий пептидазу SerP38, был слит с последовательностью ДНК, кодирующую лидерную область artНН, и находился под контролем метанолиндуцируемого промотора гена *AOX1* штамма ВКПМ Y-727 *K. kurtzmanii* (рАОХ727) [10]. Амплификацию плазмиды рРН727-SerP38 проводили в клетках штамма Top10 *Escherichia coli* (Invitrogen, США) путем культивирования соответствующих трансформантов при температуре 37 °С на среде LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл. Корректность первичной структуры фрагмента ДНК, кодирующего пептидазу SerP38 в составе амплифицированной плазмиды, подтверждена секвенированием.

Трансформацию клеток реципиентного штамма дрожжей *K. kurtzmanii* Y727his4Δ проводили по методике, описанной в работе [10]. Перед трансформацией интегрируемый фрагмент ДНК, содержащий экспрессионную кассету, высвобождали из состава плазмиды рРН727-SerP38 путем расщепления ДНК плазмиды по рестрикционным сайтам *MluI*.

Полученные трансформанты культивировали в течение 72 ч на ротационном шейкере со скоростью вращения 300 об/мин при температуре 29 °С. Для культивирования использовали среду YPGM следующего состава, %: дрожжевой экстракт — 1 (0207; BioSpringer, Франция), пептон соевый — 2 (P140; Amresco, США), глицерин — 0,5 (Panreac, Испания), метанол — 1 (техническая марка «А» ГОСТ 2222-95, Россия). Метанол вносили в среду при засеве дрожжей и далее с периодичностью в 24 ч до конечной концентрации 1%.

Электрофорез белков

Электрофорез белков культуральной жидкости (КЖ) дрожжей проводили в 15%-ном SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях с использованием

системы Mini-PROTEAN Tetra Cell (#165-8000; Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя. Использовали предокрашенные белковые маркеры (#26616; Thermo Fisher Scientific). Для приготовления образцов для фореа белки концентрировали, как описано ранее [11].

Очистка рекомбинантной пептидазы SerP38 *T. molitor* и подготовка препарата для физико-химического анализа

Ni-NTA-агарозу (Invitrogen) объемом 1 мл уравнивали буфером А (50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 300 мМ NaCl). Культуру клеток центрифугировали (12 000 g, 15 мин, 4 °С) и отбিরали КЖ. Образец КЖ объемом 50 мл доводили до рН 8,0 1 М буфером трис-НСl, смешивали с 0,5 мл суспензии Ni-NTA агарозы, уравниваемой в том же буфере, и инкубировали смесь на мешалке при температуре 4 °С в течение 2 ч. Для отделения агарозы, содержащей связавшийся белок, использовали настольную микроколонку, после чего агарозу промывали буфером А (10-кратный объем колонки). Для удаления неспецифически связавшегося материала агарозу промывали 10 объемами буфера А, содержащего 25 мМ имидазол. Целевой белок элюировали буфером А с добавлением 250 мМ имидазола. Наличие и степень чистоты препарата после хроматографии оценивали с помощью электрофореза в SDS-ПААГ.

Препарат очищенного белка обессоливали диализом (диаметр пор 3 кДа) против воды mQ. Полученный водный раствор белка концентрировали с использованием ультрафильтрации (10 кДа; Amicon, США) до конечной концентрации 0,4 мг/мл и осветляли центрифугированием при 16 000 g в течение 20 мин. Концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорда. Аликвоты замораживали в жидком азоте и лиофилизовали (Labconco, США). Всего из 300 мл КЖ было очищено 1,2 мг рекомбинантного белка.

Исследование ионзависимой агрегации рекомбинантного белка SerP38

Для анализа использовали образцы КЖ дрожжей, содержавшие секретированную пептидазу SerP38, или препарат белка, очищенный с использованием металл-хелатной хроматографии. Для стабилизации рН в анализируемые образцы вносили 1 М Трис-НСl буфер (рН 8,0) до конечной концентрации 50 мМ.

Предварительно забуференные образцы белка SerP38 осветляли центрифугированием при 16 000 g в течение 10 мин. В аликвоты полученного супернатанта вносили водный раствор

100 мМ NiSO₄ до различной конечной концентрации. В контрольный образец вместо раствора 100 мМ NiSO₄ вносили воду mQ. Полученные смеси инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин при постоянном перемешивании на Rotamix (ELMI, Латвия), после чего центрифугировали в тех же условиях. Для электрофоретического анализа использовали фракции осадка и надосадочной жидкости. Фракцию осадка солибилизировали в растворе 50 мМ ЭДТА-NaOH, рН 8,0. В образцы надосадочной жидкости вносили раствор 1 М ЭДТА-NaOH, рН 8,0, до конечной концентрации 50 мМ, после чего суммарный белок из образцов надосадочной жидкости концентрировали, как описано ранее [11].

Выявлено, что увеличение концентрации NiSO₄ в диапазоне от 0 до 15 мМ вызывало пропорциональное увеличение доли белка SerP38, осаждаемого из КЖ дрожжей в результате ионзависимой агрегации (*данные не приведены*). При концентрации NiSO₄ 15 мМ наблюдаемый эффект достигал стадии насыщения, в связи с чем данная концентрация была выбрана для проведения аналитических экспериментов.

Определение ферментативной активности рекомбинантной пептидазы SerP38 *T. molitor*

Для активации SerP38 лиофилизированные препараты профермента растворяли до концентрации 4 мкг/мл в 0,1 М ацетатно-фосфатно-боратном универсальном буфере, рН 7,9, добавляли раствор трипсина до конечной концентрации 20 нМ и инкубировали в течение 60 мин при температуре 25 °С.

Для анализа ферментативной активности процессированной пептидазы SerP38 в качестве хромогенного субстрата использовали *N*-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-*n*-нитроанилид (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA). Реакцию и расчет ферментативной активности проводили по опубликованной ранее методике [12].

Анализ рекомбинантного белка SerP38 с использованием гель-проникающей хроматографии

Колонку для высокоразрешающей гель-фильтрации Superdex 200 Increase 3.2/300 (GE Healthcare, Швеция) калибровали в соответствии с рекомендациями производителя и уравнивали буфером для гель-фильтрации (20 мМ трис-НСl, 150 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, рН 8,0). Для анализа использовали лиофилизованный препарат белка, очищенный с использованием металл-хелатной хроматографии, растворенный в буфере для уравнивания колонки.

Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрический анализ очищенного белка проводили на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Германия), оснащенный УФ-лазером (Nd). Масс-спектры получены в линейной моде режима положительных ионов с использованием рефлектрона. Точность измеренных средних масс составляла 10 Да. Для расчета значений масс белков использовали программный пакет Vector NTI (Thermo Fisher Scientific).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в отличие от бактериальных систем дрожжевые системы экспрессии способны обеспечить необходимые посттрансляционные модификации белков, которые характерны для эукариотических клеток. Для биосинтеза рекомбинантной пептидазы SerP38 была выбрана экспрессионная система *K. kurtzmanii*, зарекомендовавшая себя в качестве эффективной альтернативы широко распространенной системе экспрессии на основе дрожжей *Pichia pastoris* (Invitrogen) [10].

С целью получения штамма-продуцента рекомбинантной пептидазы SerP38 клетки реципиентного штамма дрожжей *K. kurtzmanii* Y727his4Δ были трансформированы фрагментом ДНК плазмиды pRH727-SerP38. Полученные трансформанты выращивали в условиях индукции метанолом. Образцы КЖ анализировали с использованием электрофореза. В результате ПААГ-анализа в образцах КЖ, трансформированных штаммов обнаружен целевой белок, представленный на электрофореграмме в виде двух полос: мажорной и минорной, – расположенных в области 26 кДа (рис. 1а). В образце КЖ реципиентного штамма *K. kurtzmanii* Y727his4Δ (отрицательный контроль) этих полос не было (рис. 1а). Заметным клеточным лизисом продукция целевого белка не сопровождалась. Согласно данным денситометрии, уровень продукции целевого белка в КЖ составлял от 20 до 50 мг/л. По этому показателю трансформанты *K. kurtzmanii* превосходили продуценты SerP38 на основе штамма *K. phaffii* GS115 (данные не приведены).

Электрофореграмма белка SerP38, очищенного из среды культивирования дрожжей с использованием металл-хелатной хроматографии, показала наличие тех же специфических полос, мажорной и минорной, как и при анализе образцов КЖ (рис. 1б, 2а). Разница в их подвижности составляла 3–4 кДа (рис. 2а). В то же время

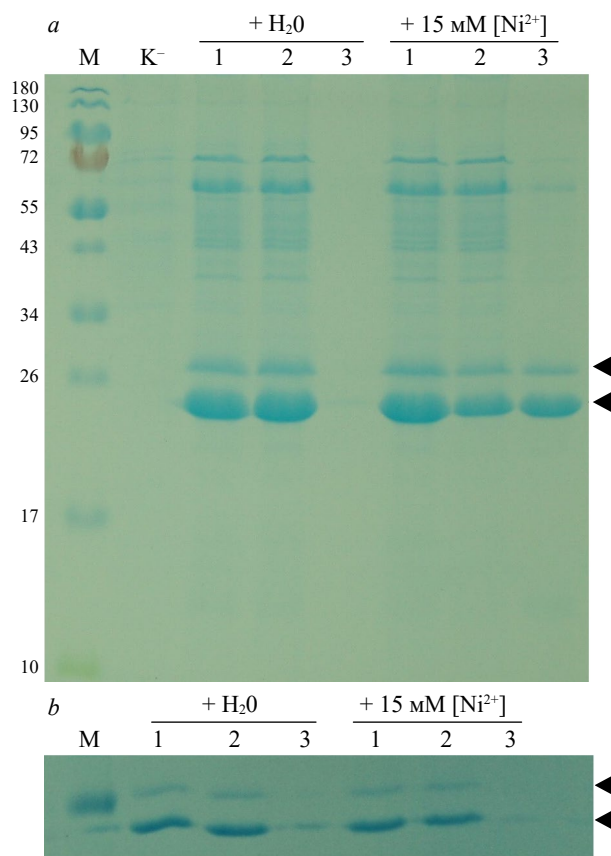


Рис. 1. Электрофоретический анализ белка SerP38, секретированного в КЖ дрожжей *K. kurtzmanii*. Анализ выполнен перед (а) и после (б) аффинной очистки белка из КЖ, проведенной с использованием Ni-NTA хроматографии. В образец КЖ, содержащий белок SerP38 (а), или в обезсоленный образец белка SerP38, очищенного с помощью металл-хелатной хроматографии (б), вносили раствор NiSO₄ до конечной концентрации 15 мМ (+15 мМ [Ni²⁺]) или равный объем деионизованной воды (+H₂O). После инкубации приготовленные смеси центрифугировали и анализировали, как описано в разделе «Условия эксперимента». На дорожки наносили: 1 — препарат до центрифугирования, 2 — супернатант после центрифугирования препарата 1, 3 — осадок после центрифугирования препарата 1. Здесь и далее: М – маркеры молекулярной массы (#26616; Thermo Fisher Scientific). Стрелками указаны мажорная и минорная полосы белка SerP38.

Fig. 1. Electrophoretic analysis of the SerP38 protein secreted in the culture medium of the yeast *K. kurtzmanii*. The analysis was performed before (a) and after (b) affinity purification of the protein from culture medium, carried out using Ni-NTA chromatography. A culture medium sample containing SerP38 protein (a), or desalted sample of SerP38 protein purified by metal chelate chromatography (b), were supplemented with a solution of NiSO₄ to a final concentration of 15 mM (+15 mM [Ni²⁺]) or with an equal volume of deionized water (+H₂O). After incubation, the prepared mixtures were centrifuged and analyzed as described in the Experimental section. The following was applied to the lanes: 1 — preparation before centrifugation, 2 — supernatant after centrifugation of preparation 1, 3 — sediment after centrifugation of preparation 1. Hereinafter: M — molecular weight markers (#26616; Thermo Fisher Scientific). The arrows indicate the major and minor bands of the SerP38 protein.

проведенный масс-спектрометрический анализ очищенного белка выявил две основные изоформы, молекулярная масса которых различалась всего на 0,8 кДа (рис. 3).

Сопоставление данных масс-спектрометрического анализа с последовательностью белка SerP38 показало, что обнаруженные изоформы могли представлять собой укороченные с N-конца производные профермента, в составе которых отщепляемый при созревании фермента 12-членный пропептид (SPLDVDPLYSWR) усечен до последовательности LDVDPLYSWR или SWR соответственно (табл. 1). Эти укороченные изоформы могли появиться в результате автокаталитического процессинга и/или деградации белка. Других изоформ целевого белка в области, соответствующей диапазону молекулярной массы 8–70 кДа, по данным масс-спектрометрического анализа не выявлено. Также, несмотря на присутствие в последовательности SerP38 потенциального сайта N-гликозилирования, ни обработка эндо- β -N-ацетилглюкозаминидазой Н (данные не приведены), ни масс-спектрометрический анализ (рис. 3) не выявили присутствия в составе очищенного препарата гликозилированных форм целевого белка. Таким образом, выявленные с помощью масс-спектрометрии два производных белка SerP38 могли соответствовать двум полосам на электрофореграмме только в случае, если какая-либо из укороченных изоформ SerP38 обладала аномальной подвижностью.

Отлаживая методику аффинной очистки пептидазы SerP38 из КЖ *K. kurtzmanii*, мы столкнулись с низким выходом очищенного продукта, который не превышал 50% (рис. 1а, 2а). Одновременно с этим было обнаружено, что секретированный в КЖ целевой белок оказался чувствительным к внесению в среду низких концентраций His₆-tag-связывающих катионов, таких как Ni²⁺. Так, например, при внесении в КЖ ионов Ni²⁺ до конечной концентрации 15 мМ почти половина первоначально растворимого целевого белка агрегировала и могла быть осаждена центрифугированием (рис. 1а). Данное явление было названо ионзависимой агрегацией белка. Одна из его главных особенностей – высокая селективность процесса, не затрагивавшего другие белки КЖ. Другой особенностью была высокая специфичность: ионзависимой агрегации подвергался только исходный белок SerP38, продуцированный дрожжами, в то время как белок, очищенный с использованием Ni-NTA, способности к ионзависимой агрегации не демонстрировал (рис. 1б). Установлено, что помимо

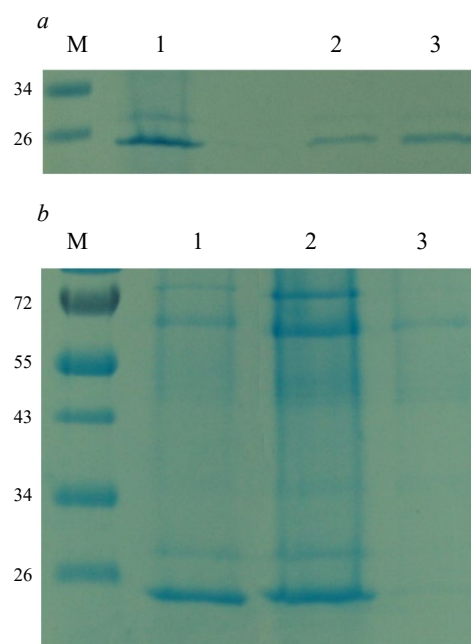


Рис. 2. Электрофоретический анализ фракций, полученных при очистке целевого белка из КЖ *K. kurtzmanii* методом металл-хелатной хроматографии. *a* – Фракции Ni-NTA-хроматографии КЖ: 1 — прорыв; 2 — промывка 25 мМ имидазолом; 3 — элюция 250 мМ имидазолом. *b* – Ультрафильтрация образца КЖ, полученного в виде прорыва с Ni-NTA-агарозы и предположительно содержащего белок SerP38: 1 — препарат до фильтрации; 2 — сконцентрированная фракция на мембране 500 кДа; 3 — прорыв.

Fig. 2. Electrophoretic analysis of fractions obtained during purification of the target protein from *K. kurtzmanii* culture medium by metal chelate chromatography. *a* — Fractions of Ni-NTA chromatography of culture medium: 1 — breakthrough; 2 — washing with 25 mM imidazole; 3 — elution with 250 mM imidazole. *b* — Ultrafiltration of a culture medium sample obtained in the form of a breakthrough from Ni-NTA-agarose and presumably containing the SerP38 protein: 1 — preparation before filtration; 2 — concentrated fraction on a 500 kDa membrane; 3 — breakthrough.

никеля эффективную агрегацию SerP38 вызывали также ионы цинка, меди и кобальта, но не магния и кальция (данные не приведены).

Одна из догадок, призванных объяснить обнаруженный эффект, связывала аномальное поведение с неоднородным состоянием рекомбинантного белка SerP38 в КЖ, а именно с наличием в КЖ мономерных и олигомерных водорастворимых форм белка. Известно, что некоторые химотрипсиноподобные пептидазы, к которым относится SerP38, склонны к образованию олигомерных форм [13]. Среди рекомбинантных белков, ранее продуцированных в дрожжах, олигомерные

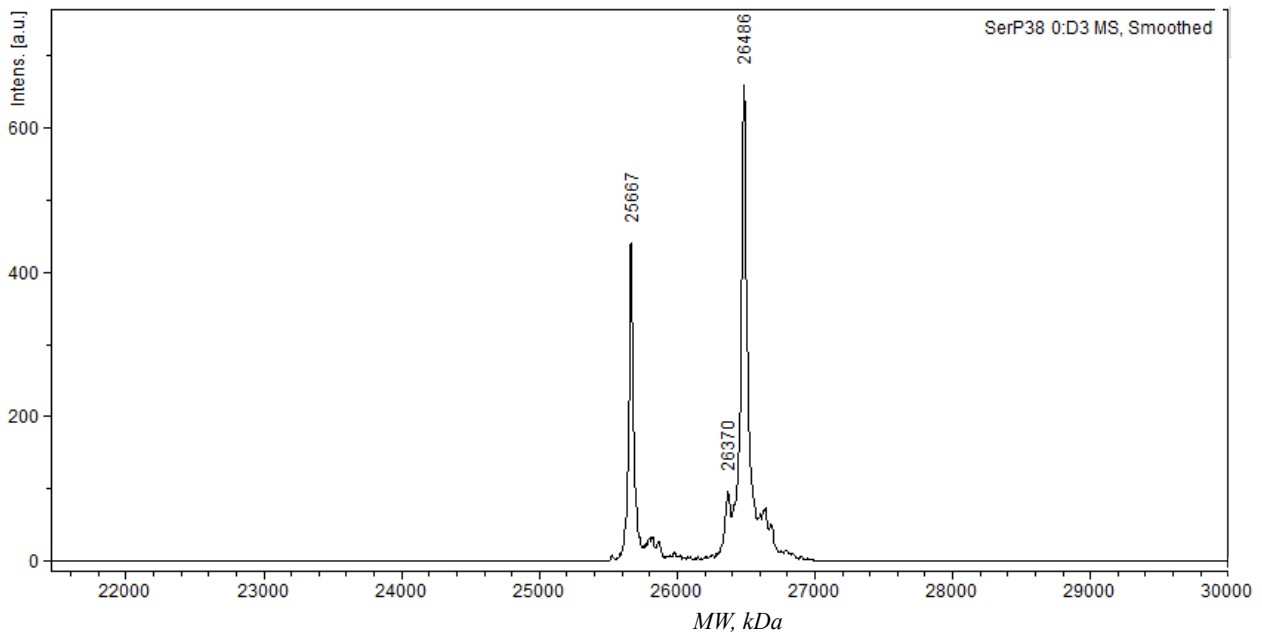


Рис. 3. Масс-спектрометрический анализ препарата белка SerP38, очищенного из КЖ *K. kurtzmanii* с использованием Ni-NTA хроматографии.

Fig. 3. Mass spectrometric analysis of the SerP38 protein preparation purified from *K. kurtzmanii* culture medium using Ni-NTA chromatography.

Таблица 1

Масс-спектрометрический анализ очищенного белка SerP38

Mass spectrometric analysis of the purified SerP38 protein

Производные SerP38	M _r , Да	
	Масс-спектр	Расчетная
SPLDVDPLYSWR — (mature SerP38)	нет	26661
SWR — (mature SerP38)	25667	25661
LDVDPLYSWR — (mature SerP38)	26486	26477

формы были выявлены, например, для гранулоцитарного колониестимулирующего фактора [14].

В пользу догадки свидетельствовали результаты, показавшие, что способность к ионзависимой агрегации относилась к собственным свойствам белка SerP38, не зависевшим от компонентов среды культивирования дрожжей, пептона и дрожжевого экстракта, включая компонент экстракта — тРНК (*данные не представлены*), вызывавших агрегацию рекомбинантного сывороточного альбумина человека [15]. Также в пользу этой гипотезы свидетельствовали результаты ультрафильтрации образца SerP38, которые показали, что бóльшая часть исследуемого белка, полученного во фракции проскока с Ni-NTA-агарозы, задерживалась на мембране с диаметром пор 500 кДа, то есть находилась в олигомерной форме (рис. 2b). В то же время другая часть целевого белка КЖ, связавшегося с Ni-NTA и очищенного с использованием хроматографии, содержала

только мономерные формы, молекулярная масса которых не превышала 30 кДа (рис. 4).

В пользу существования двух форм белка SerP38, находящихся в разном агрегатном состоянии, очищенной с помощью Ni-NTA-хроматографии и осажденной в результате ионзависимой агрегации, свидетельствовали также результаты определения ферментативной активности соответствующих препаратов. Так, препарат целевого белка, очищенный Ni-NTA-хроматографией, активировался под действием трипсина (за счет отщепления пропептида с N-конца белка) и проявлял высокую гидролитическую активность в отношении хромогенного субстрата (рис. 5). В то же время препарат белка, осажденного солью никеля, не активировался трипсином и не проявлял ферментативной активности (рис. 5).

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что часть секретированного дрожжами белка SerP38 присутствовала

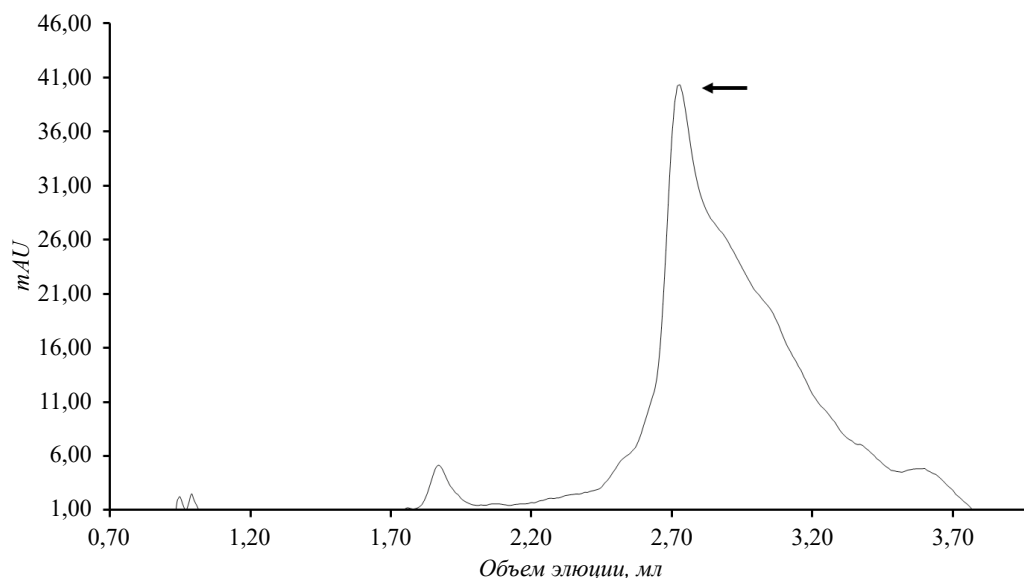


Рис. 4. Гель-проникающая хроматография на колонке Superdex 200 Increase 3.2/300 препарата SerP38, очищенного на Ni-NTA-агарозе. Согласно калибровке, молекулярная масса целевого белка (показана стрелкой на профиле элюции) не превышала 30 кДа.

Fig. 4. Gel permeation chromatography on a Superdex 200 Increase 3.2/300 column of SerP38 purified on Ni-NTA agarose. According to calibration, the molecular weight of the target protein (shown by an arrow on the elution profile) did not exceed 30 kDa.

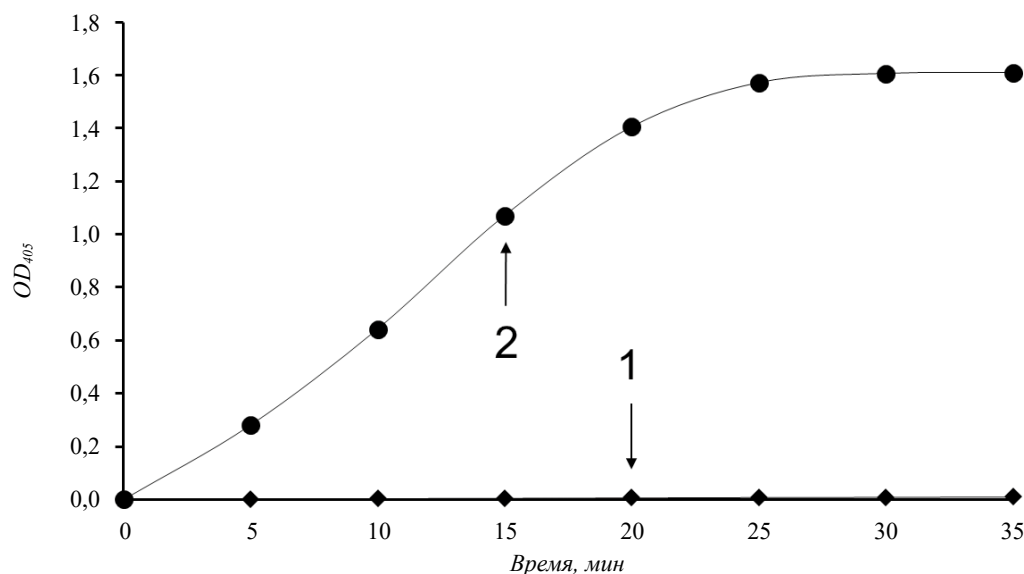


Рис. 5. Гидролитическая активность препаратов SerP38, полученных с использованием ионзависимой агрегации и последующего осаждения (1) и с использованием аффинной очистки на Ni-NTA-агарозе (2). Препараты белка обрабатывали трипсином и оценивали ферментативную активность SerP38, используя в качестве хромогенного субстрата 0,25 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, по изменению оптической плотности при длине волны 405 нм (OD_{405}).

Fig. 5. Hydrolytic activity of SerP38 preparations obtained using ion-dependent aggregation and subsequent precipitation (1), and using affinity purification on Ni-NTA-agarose (2). Protein preparations were treated with trypsin and the enzymatic activity of SerP38 was assessed using 0,25 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA as a chromogenic substrate, the change of optical density at 405 nm (OD_{405}).

в КЖ в неактивной конформации в форме водорастворимых комплексов большой молекулярной массы. Наиболее вероятно, что обнаруженные комплексы были образованы олигомерами белка SerP38, которые в этом случае оказывались маркированы множеством His₆-tag. Как следствие,

многочисленные контакты, возникающие между комплексами в присутствии ионов Ni²⁺ в результате образования большого количества связей между входившими в их состав His₆-tag, способных координировать ионы Ni²⁺, в конечном итоге и вызывали ионзависимую агрегацию белка SerP38.

Пептидаза SerP38 является потенциально ценным промышленным ферментом. В результате проведенной работы впервые показано, что пептидаза SerP38 хрущака *T. molitor* может быть эффективно продуцирована в дрожжах *K. kurtzmanii* и в процессе секреции целевой белок, имеющий His₆-tag на С-конце, накапливается в КЖ в двух формах. Одна из них представлена мономером, который может быть эффективно очищен с использованием Ni-НТА хроматографии и активирован трипсином; другая форма, по-видимому, присутствует в КЖ в виде олигомеров.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.х.н. М.В. Серебряковой (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова) за проведение масс-спектрометрического анализа, д.х.н. И.Ю. Филипповой (химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) за помощь в разработке условий процессинга профермента SerP38, к.х.н. А.В. Власкиной (Курчатовский геномный центр НИЦ «Курчатовский институт») за помощь в проведении гель-проникающей хроматографии и Г.Е. Константиновой (НИЦ «Курчатовский институт») за помощь в очистке препаратов целевого белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vinokurov K.S., Elpidina E.N., Oppert B., et al. Diversity of digestive proteinases in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 2006, 145(2), 126–137. doi: 10.1016/j.cbpb.2006.05.005
2. Rawlings N.D., Barrett A.J., Thomas P.D., et al. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.*, 2018, 46(1), 624–632. doi: 10.1093/nar/gkx1134
3. Elpidina E.N., Tsybina T.A., Dunaevsky Y.E., et al. A chymotrypsin-like proteinase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Biochimie*, 2005, 87(8), 771–779. doi: 10.1016/j.biochi.2005.02.013
4. Цыбина Т.А., Дунаевский Я.Е., Белозерский М.А. и др. О пищеварительных протеиназах личинок вредителя запасов зерновых культур *Tenebrio molitor*: очистка и характеристика трипсиноподобной протеиназы. *Биохимия*, 2005, 70(3), 370–377. doi: 10.1007/s10541-005-0115-2
5. Prabhakar S., Chen M.S., Elpidina E.N., et al. Sequence analysis and molecular characterization of larval midgut cDNA transcripts encoding peptidases from the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. *Insect. Mol. Biol.*, 2007, 16(4), 455–468. doi: 10.1111/j.1365-2583.2007.00740.x
6. Tribolium Genome Sequencing C., Richards S., Gibbs R.A., et al. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 2008, 452(7190), 949–955. doi: 10.1038/nature06784
7. Martynov A.G., Elpidina E.N., Perkin L., et al. Functional analysis of C1 family cysteine peptidases in the larval gut of *Tenebrio molitor* and *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics*, 2015, 16, 75. doi: 10.1186/s12864-015-1306-x
8. Perona J.J., Craik C.S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.*, 1995, 4(3), 337–360. doi: 10.1002/pro.5560040301
9. Naumov G.I., Naumova E.S., Tyurin O.V., et al. *Komagataella kurtzmanii* sp. nov., a new sibling species of *Komagataella (Pichia) pastoris* based on multigene sequence analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 104(3), 339–347. doi: 10.1007/s10482-013-9956-7
10. Матвеева А.Ю., Губайдуллин И.И., Федоров А.С. и др. Оптимизация экспрессии гена 1,3-1,4-β-глюканазы *Rhizomucor miehei* в дрожжах *Komagataella kurtzmanii*. *Биотехнология*, 2019, 35(5), 3–11. doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-3-11
11. Kozlov D.G., Yagudin T.A. Antibody fragments may be incorrectly processed in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.*, 2008, 30(9), 1661–1663. doi: 10.1007/s10529-008-9739-9
12. Терещенкова В.Ф., Клячко Е.В., Беневоленский С.В. и др. Получение и очистка рекомбинантной дипептидилпептидазы 4 *Tenebrio molitor*. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2019, 55(3), 231–236. doi: 10.1134/S0555109919030140
13. Botos I., Meyer E., Nguyen M., et al. The structure of an insect chymotrypsin. *J. Mol. Biol.*, 2000, 298(5), 895–901. doi: 10.1006/jmbi.2000.3699
14. Bae C.S., Yang D.S., Lee J., et al. Improved process for production of recombinant yeast-derived monomeric human G-CSF. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 52(3), 338–344. doi: 10.1007/s002530051529
15. Cheperegin S.E., Efremov B.D., Kozlov D.G. Precipitation of human serum albumin from yeast culture liquid at pH values below 5. *Protein Expression Purif.*, 2010, 72(2), 205–208. doi: 10.1016/j.pep.2010.04.005

Biosynthesis and Secretion of Serine Peptidase SerP38 from *Tenebrio molitor* in the Yeast *Komagataella kurtzmanii*

A.A. GORBUNOV¹, P.I. AKENTYEV², I.I. GUBAIDULLIN^{1,2}, N.I. ZHIGANOV³,
V.F. TERESHCHENKOVA⁴, E.N. ELPIDINA⁵, D.G. KOZLOV^{1*}

¹ National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, 123182, Russia

² National Research Center «Kurchatov Institute» – GOSNIIGENETIKA, Kurchatov Genomic Center, Moscow, 117545, Russia

³ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia

⁴ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia

⁵ A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia

*e-mail: Kozlov_DG@rrcki.ru

Received November 10, 2020

Revised November 16, 2020

Accepted December 11, 2020

Abstract—A strain of the *Komagataella kurtzmanii* yeast, a producer of recombinant peptidase SerP38 from the yellow mealworm *Tenebrio molitor*, has been obtained. The level of the pro-enzyme secretion was 20–50 mg/L. It was shown that, during secretion in yeast, the target His₆-tagged protein was produced in two forms. One of them was a monomer that was efficiently purified by Ni-NTA chromatography and then activated with trypsin. Another form accumulated in the culture medium as oligomers prone to aggregation in the presence of Ni²⁺ ions and was not activated by trypsin treatment. Aggregation is likely the result of incorrect folding of the polypeptide chain.

Key words: *Tenebrio molitor*, S1 family serine peptidase, SerP38, yeast, *Komagataella kurtzmanii*, ion-dependent aggregation

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-78-86