

## РАЗРАБОТКА ОСНОВ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО КАТЕПСИНА *L. Tribolium castaneum* В ДРОЖЖАХ *Komagataella kurtzmanii*

© 2022 г. А. В. Серкина<sup>1</sup>, И. И. Губайдуллин<sup>1, 2</sup>, Ф. И. Акентьев<sup>1, 2</sup>, И. А. Домбровский<sup>3</sup>, И. Ю. Филиппова<sup>3</sup>, Е. Н. Элпидина<sup>4</sup>, Д. Г. Козлов<sup>1</sup>, Н. В. Булушова<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

<sup>2</sup>НИЦ “Курчатовский институт” – ГосНИИгенетика, Курчатовский геномный центр, Москва, 117545 Россия

<sup>3</sup>Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

<sup>4</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: Bulushova\_NV@rrcki.ru

Поступила в редакцию 26.10.2021 г.

После доработки 12.11.2021 г.

Принята к публикации 16.11.2021 г.

На базе метилотрофных дрожжей *Komagataella kurtzmanii* получен штамм-продуцент рекомбинантного прокатепсина *L. Tribolium castaneum* (гpTcCathL), обеспечивший биосинтез и секрецию не менее 0,5 г/л целевого белка в условиях культивирования в колбах на среде комплексного состава. Определено, что рН среды культивирования дрожжей ( $\text{pH} \geq 6.5$ ) является ключевым фактором, влияющим на биосинтез и накопление прокатепсина. Разработана новая схема хроматографической очистки, позволяющая получать рекомбинантный прокатепсин с выходом около 30% и чистотой свыше 95%. Показано, что полная автокаталитическая активация профермента достигается при температуре 37°C, рН 4.0–4.5 в течение не более 30 мин. При этом в концентрации 0.5 мг/мл и ниже препараты рекомбинантного прокатепсина и активированного катепсина могут сохраняться без детектируемых изменений при температуре +4°C в течение, минимум, двух недель. Таким образом, в результате проведенных исследований были разработаны основы технологии получения и хранения рекомбинантных препаратов высокоочищенного главного пищеварительного катепсина *L. T. castaneum* в форме профермента и зрелого катепсина L.

**Ключевые слова:** рекомбинантные ферменты, штамм-продуцент, выделение и очистка, пищеварительный катепсин L, *Tribolium castaneum*, целиакия

**DOI:** 10.56304/S0234275822030085

Особое место в общем объеме производства ферментов занимают высокоочищенные препараты, востребованные для медицины, аналитических целей и научных исследований. Однако из-за сложной технологии очистки, требующей больших материальных и временных затрат, доля таких препаратов в общем объеме производства мала. В то же время именно очистка ферментов является очень важным шагом к их правильной идентификации, пониманию механизма действия и функции, а также для правильной оценки возможности применения фермента в промышленности.

*Список сокращений:* гpTcCathL – рекомбинантный прокатепсин *L. Tribolium castaneum*; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; КЖ – культуральная жидкость; SDS-ПААГ – полиакриламидный гель, содержащий додецилсульфат натрия.

Катепсин L относится к классу цистеиновых пептидаз и входит в состав обширного семейства С1, родоначальником которого является растительная протеаза папаин, [1]. Ферменты этого семейства (папаин, бромелаин, фицин) являются легкодоступными и находят широкое практическое применение в пищевой и фармацевтической промышленности [2, 3]. Кроме того, эти протеазы обладают бактерицидными и бактериостатическими свойствами, обуславливающими их активность в составе противовоспалительных препаратов [4, 5].

В отличие от вышеперечисленных ферментов катепсины, несмотря на пристальный интерес, пока не нашли практического применения для решения тех или иных прикладных задач.

В настоящее время предметом фундаментальных научных и медицинских исследований цистеиновые катепсины являются прежде всего в свя-

зи с их участием в развитии различных патологических состояний, от ревматоидного артрита до метастазирования и роста раковых опухолей [6, 7].

Между тем, многообразие катепсиновых пептидаз, их широкая субстратная специфичность, вовлеченность в процессы клеточного протеолиза и процессинга белков свидетельствуют о высоком протеолитическом потенциале этой группы ферментов и создают предпосылки для возможностей их практического использования.

С этой точки зрения большой интерес представляет катепсин L — главная пищеварительная пептидаза насекомых семейства Tenebrionidae, вредителей зерновых запасов [8]. Наши исследования показали, что эта протеиназа обладает необычной специфичностью и способна гидролизовать аналоги иммунногенных глутамин- и пролин-богатых пептидов глиадинов, являющихся причиной тяжелого аутоиммунного заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) — целиакии [8–10]. Выявленные особенности фермента позволяют обоснованно надеяться на высокую перспективность практического использования этой пептидазы для заместительной энзимотерапии при патологиях ЖКТ человека и получения качественных безглютеновых продуктов, необходимых для питания больных людей. В связи с этим разработка способа получения препарата рекомбинантного катепсина L *Tribolium castaneum* является актуальной задачей.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Реагенты

Триптон, пептон, дрожжевой экстракт, глюкоза, глицерин были получены от компании “Диам” (Россия). Все ферменты для молекулярных работ — производства фирмы Thermo Fisher Scientific (США). Соли и другие реагенты были получены от фирмы “Хеликон” (Россия). Все реактивы отечественного производства имели квалификацию “хч” или “чда”.

### Конструирование и культивирование штаммов-продуцентов

Для экспрессии рекомбинантного прокатепсина L *T. castaneum* использовали реципиентные штаммы Y727 his4Δ и Y724 his4Δ arg4Δ [11], производные штамма *K. kurtzmanii* ВКПМ Y-727 [12].

Трансформацию клеток реципиентных штаммов проводили, как описано в работе [13]. С целью элиминации бактериальных частей перед трансформацией ДНК плазмид обрабатывали рестриктазой *MluI* [14].

Культивирование полученных трансформантов проводили на среде YP<sub>g</sub>M в течение 72 ч как описано ранее [14, 15]. Для культивирования использовали

ротационный шейкер (CERTOMAT BS-1, Sartorius, Германия) (250 об/мин; 30°C). Метанол вносили в среду до конечной концентрации 1% каждые 24 ч. По окончании ферментации образцы КЖ освобождали от клеток с помощью центрифугирования 20 мин при 14000 g (Eppendorf 5804R, Германия). В полученные бесклеточные образцы КЖ вносили азид натрия NaN<sub>3</sub> (CAS#26628-22-8, Helicon) до конечной концентрации 1 мМ, после чего образцы фильтровали с использованием шприцевого фильтра с диаметром пор 0.45 мкм (ALWSCI, Китай).

### Гель-электрофорез

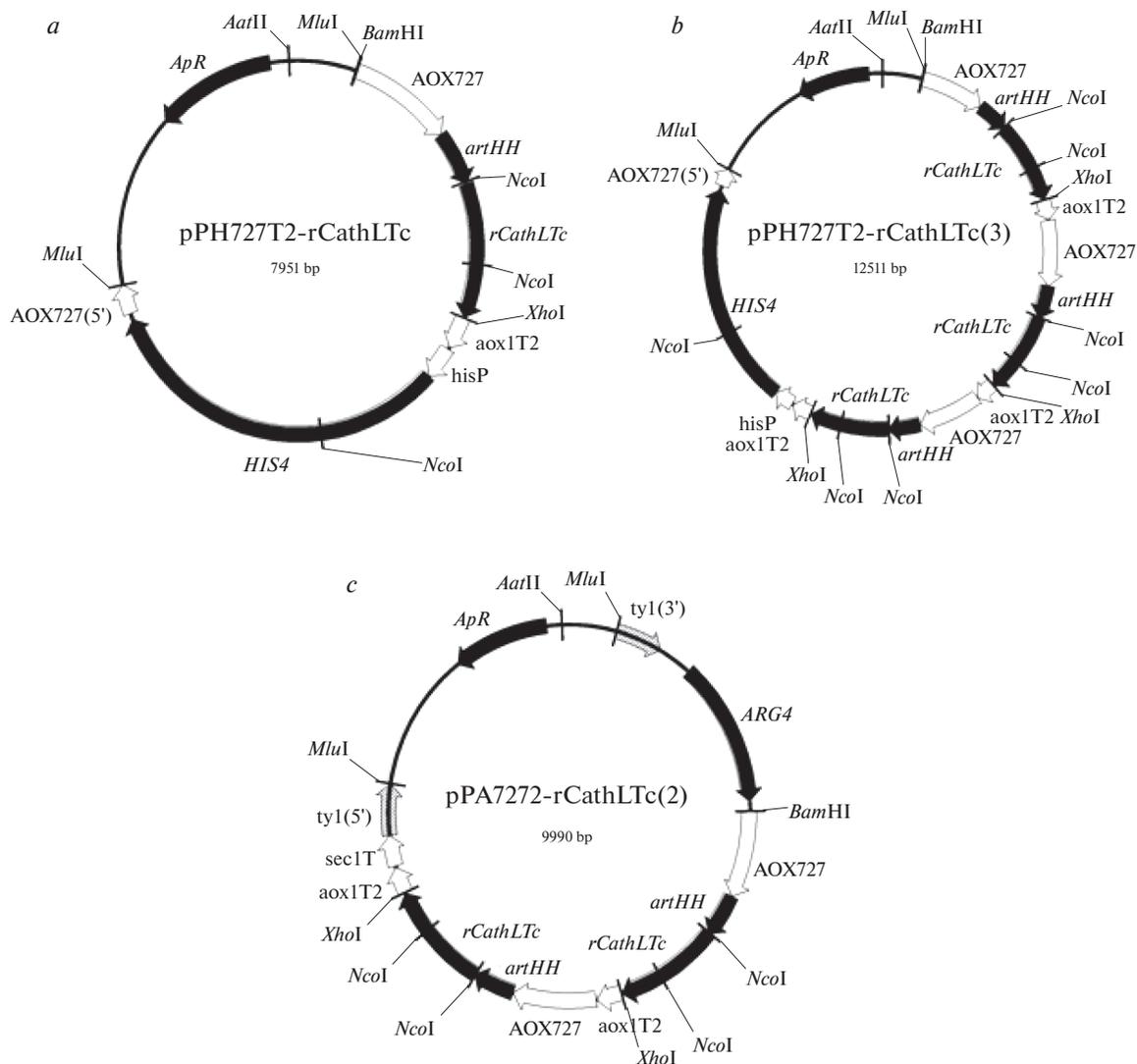
Электрофорез белков проводили в 12.5%—ном SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях с использованием системы Mini-PROTEAN Tetra Cell (#165-8000; Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя. Использовали предокрашенные белковые маркеры (#26616; Thermo Fisher Scientific). Белки из культуральной жидкости концентрировали, как описано ранее [16].

### Конструирование плазмид

В работе Матвеевой А.Ю. [14] описан базовый вектор pRH727-AOX727, содержащий маркерный ген *HIS4*, используемый для получения трансформантов реципиентных штаммов *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*, несущих аутокотрофную мутацию *his4*.

В настоящей работе использовали вариант вектора pRH727T2-artHH, содержащий в составе экспрессионной кассеты мощный метанол-индуцируемый промотор *AOX1* и последовательности ДНК, кодирующие лидерную область artHH и терминатор транскрипции aox1T2. В составе вектора на границе последовательностей ДНК, кодирующих лидерную область и структурный ген целевого секретируемого белка, располагается уникальный сайт узнавания эндонуклеазы *BglII*.

Для конструирования вектора pRH727T2-рTcCathL (рис. 1a) получали структурный ген, кодирующий рекомбинантный прокатепсин рTcCathL1 (NP\_001164001). Для этого использовали ПЦР, матрицей для которой служила ДНК плазмиды pPICZalphaA-рTcCathL1 [17]. Амплификацию проводили с использованием праймеров N1772 (5'-atatggatccgaggctgaagctaatgggct) и N1773 (5'-aatctcgagttacaaggctgggtatgaagca). Полученный фрагмент ДНК размером около 940 п.о. подвергали обработке по концевым сайтам с помощью эндонуклеаз *BamHI* и *XhoI*, после чего лигировали его с векторной *BglII/XhoI* частью плазмиды pRH727T2-artHH. В результате лигирования получили искомую плазмиду pRH727T2-рTcCathL (рис. 1a), содержащую одну копию целевой кассеты экспрессии AOX727-artHH-рTcCathL-aox1T2.



**Рис. 1.** Карты плазмид: *a* – pPH727T2-rpTcCathL, *b* – pPH727T2-rpTcCathL(3), *c* – pPA7272-rpTcCathL(2). Условные обозначения: rpTcCathL – структурный ген рекомбинантного прокатепсина L *T. castaneum*; artHH – последовательность ДНК, кодирующая лидерный пептид, направляющий секрецию рекомбинантного катепсина rpTcCathL; ty1(5') в паре ty1(3'), а также AOX727(5') в паре с AOX727 – области, направляющие гомологичную рекомбинацию и адресную интеграцию векторов в геном реципиентных штаммов дрожжей *K. kurtzmanii*; AOX727 – промоторная область гена *AOX1* штамма дрожжей *K. kurtzmanii* Y-727; *HIS4* и *ARG4* структурные гены дрожжей *K. kurtzmanii*, используемые в качестве селективных маркеров; aox1T2, sec1T – области терминации транскрипции генов *AOX1* дрожжей *K. kurtzmanii* и *SEC1* дрожжей *S. cerevisiae*; ApR – ген устойчивости к ампициллину. Показано расположение сайтов рестрикции *AatII*, *BamHI*, *MluI*, *NcoI* и *XhoI*.

**Fig. 1.** Plasmid maps: *a* – rRN727T2-rpTcCathL, *b* – rRN727T2-rpTcCathL(3), *c* – rRA7272-rpTcCathL(2). Symbols: rpTcCathL is a structural gene of recombinant procathepsin L *T. castaneum*; artHH is a DNA sequence encoding a leader peptide directing the secretion of recombinant procathepsin rpTcCathL; ty1(5') paired with ty1(3'), as well as AOX727(5') paired with AOX727 are regions directing homologous recombination and targeted integration of vectors into the genome of recipient strains of yeast *K. kurtzmanii*; AOX727 is the promoter region of the *AOX1* gene of the yeast strain *K. kurtzmanii* Y-727; *HIS4* and *ARG4* are structural genes of yeast *K. kurtzmanii* used as selective markers; aox1T2, sec1T are transcription termination regions of *AOX1* genes of yeast *K. kurtzmanii* and *SEC1* of yeast *S. cerevisiae*; ApR is an ampicillin resistance gene. The location of restriction sites *AatII*, *BamHI*, *MluI*, *NcoI* and *XhoI* is shown.

На следующем этапе использовали вспомогательную лабораторную плазмиду A3del-aox1T1, содержащую в составе *XhoI/BglII* фрагмента ДНК последовательность терминатора транскрипции гена *AOX1* штамма *K. kurtzmanii*.

Плазмиду A3del-rpTcCathL получали путем лигирования *AatII/XhoI* фрагмента ДНК плазмиды pPH727T2-rpTcCathL, заключающим ген rpTcCathL, с векторной *AatII/XhoI* частью вспомогательной плазмиды A3del-aox1T1. В результате кло-

нирования в составе плазмиды A3del-rpTcCathL был собран *Bam*HI/*Bgl*II фрагмент ДНК, с одной копией целевой кассеты экспрессии АОХ727-artHH-rpTcCathL-aox1T. В составе плазмиды A3del-rpTcCathL за пределами целевой кассеты в окружении сайта *Bam*HI располагаются уникальные сайты узнавания эндонуклеаз *Aat*II и *Mlu*I. Их расположение в совокупности с уникальными сайтами *Bam*HI и *Bgl*II позволило удвоить число копий целевой кассеты в составе вектора путем лигирования *Aat*II/*Bgl*II фрагмента ДНК плазмиды A3del-rpTcCathL с векторной *Aat*II/*Bam*HI частью этой же плазмиды. В результате лигирования получили плазмиду A3del-rpTcCathL(2), содержащую в составе *Aat*II(*Mlu*I, *Bam*HI)/*Bgl*II фрагмента ДНК две тандемно расположенные копии целевой кассеты экспрессии.

На следующем этапе 2 копии целевой кассеты из состава вспомогательной плазмиды A3del-rpTcCathL(2) перенесли в плазмиду рРН727T2-rpTcCathL, уже содержащую 1 копию кассеты. С этой целью *Aat*II/*Bgl*II фрагмент ДНК вспомогательной плазмиды A3del-rpTcCathL(2) клонировали в плазмиде рРН727T2-rpTcCathL, расщепленной по сайтам *Aat*II/*Bam*HI. В результате получили плазмиду рРН727T2-rpTcCathL(3), с тремя тандемно расположенными копиями целевой кассеты экспрессии (рис. 1b).

Плазида рРА7272-rpTcCathL(2) (рис. 1c), содержащая 2 копии целевой кассеты экспрессии, была сконструирована на основе ранее разработанного лабораторного вектора рРА7272 (Д.Г. Козлов, неопубл. рез.) аналогично плазмиде рРН7272-rpTcCathL(3). Особенностями плазмиды рРА7272-rpTcCathL(2) является наличие в ее составе маркерного гена *ARG4 K. kurtzmanii*, из последовательности которого путем сайт направленного мутагенеза были удалены сайты узнавания эндонуклеаз *Aat*II, *Bgl*II и *Xho*I, а также способность направлять интеграцию в локус *his4Δ* в геноме дрожжей *K. kurtzmanii*. С этой целью в ходе конструирования *his4Δ* штаммов *K. kurtzmanii* в их геном был интегрирован искусственный фрагмент ДНК, являющийся частью структурного гена ретротранспозона *Ty1* дрожжей *S. cerevisiae* [11]. Одновременно 5'-концевая и 3'-концевая части этого фрагмента были использованы в составе плазмиды рРА7272-rpTcCathL(2) (рис. 1c) в качестве областей гомологии (гомологических плеч), фланкирующих целевую интегрируемую ДНК, обеспечивающих адресную рекомбинацию с хромосомным локусом в процессе трансформации. Аналогично производным вектора рРН727-АОХ727 с целью элиминации бактериальной части перед трансформацией препарат плазмиды рРА7272-rpTcCathL(2) обрабатывали рестриктазой *Mlu*I.

Таким образом, в результате генно-инженерных манипуляций были сконструированы 3 целе-

вых плазмиды, рРН727T2-rpTcCathL, рРН727T2-rpTcCathL(3) и рРА7272-rpTcCathL(2), содержащих 1, 3 и 2 копии целевой кассеты экспрессии, соответственно (рис. 1).

#### Очистка рекомбинантного прокатепсина *L. T. castaneum*

Супернатант, полученный после центрифугирования культуральной жидкости (Avanti J-30I, Beckman Coulter, США) (36 000 g; 20 мин), разводили в 3 раза буфером 20 mM трис-HCl pH 8.4 (буфер А) и наносили на колонку с Q-сефарозой (Cytiva, США), уравновешенную тем же буфером. Элюцию целевого белка осуществляли ступенчатым градиентом 0.2, 0.4, 0.6 и 1 M хлорида натрия в буфере А.

Фракции, полученные в ходе хроматографии, анализировали посредством ПААГ-электрофореза в 12%-ном геле. Концентрацию белка определяли методом Бредфорда, используя специализированный набор ("Диаэм", Россия), согласно инструкции. Стандартом служил бычий сывороточный альбумин ("Диаэм").

Для дальнейшей очистки целевого белка к элюату с Q-сефарозы добавляли сульфат аммония до концентрации 1 M, смесь инкубировали 30 мин при температуре 4°C, центрифугировали и наносили на колонку HiTrap Phenyl HP (Cytiva, уравновешенную буфером А, содержащим 1 M сульфат аммония). Целевой белок элюировали с колонки при понижении концентрации соли до 0.7 M.

Полученный элюат подвергали ультрадильтрации в тангенциальном потоке на установке Viva-Flow (Sartorius, Германия) с использованием фильтрующего модуля с отсекающим размером пор 10 кДа. Конечная концентрация целевого белка после ультрадильтрации составляла 0.3 мг/мл. Препарат белка разливали по флаконам, часть лиофильно высушивали, часть хранили при температуре 4°C до использования.

Чистоту полученных препаратов контролировали SDS-ПААГ-электрофорезом и гель-проникающей хроматографией на колонке Superdex 75.

Ускоренную очистку прокатепсина из КЖ высаливанием сульфатом аммония проводили как описано в [17].

#### Активация прокатепсина *L*

Проводили автокаталитическую активацию прокатепсина *L. T. castaneum*. С этой целью в раствор прокатепсина *L. T. castaneum* добавляли 1 M ацетат натрия (~1/10 объема), снижая кислотность до pH 4.0, и раствор 0.1 M цистеина до конечной концентрации 6 mM. Смесь инкубировали 2 ч при температуре 37°C, отбирая пробы каж-

дые 15 мин. Ход протеолиза контролировали SDS-ПААГ-электрофорезом.

#### Определение ферментативной активности катепсина L

Активность фермента по гидролизу азоказеина определяли в реакционной смеси, которая содержала 100 мкл 2%-ного раствора азоказеина, 480 мкл буфера 0.1 М трис-HCl pH 8.0 и 20 мкл раствора активированного фермента. Реакцию проводили в течение 30 мин при 37°C и останавливали добавлением 98 мкл 50%-ной ТХУ. Полученную смесь инкубировали 15 мин при 4°C, центрифугировали при 20800 g в течение 7 мин, после чего 650 мкл надосадочной жидкости смешивали с равным объемом 1 М NaOH. Оптическую плотность результирующего раствора измеряли при длине волны 450 нм с использованием спектрофотометра Shimadzu (Япония).

За единицу активности катепсина L принимали количество фермента, вызывавшее увеличение оптической плотности результирующего раствора на 0.1 единицу за 1 мин.

Активность катепсинов по селективному дипептидному *n*-нитроанилидному субстрату Glp-Phe-Gln-pNA, где Glp – пироглутамил- pNA – *n*-нитроанилид, проводили по методу описанному в [17].

Удельная активность, измеренная по селективному субстрату Glp-Phe-Gln-pNA, превышает измеренную активность по азоказеину приблизительно в 20 раз.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Конструирование многокопийного штамма-продуцента

В работе Дворяковой с соавт. описано получение продуцента рекомбинантного прокатепсина grTcCathL с использованием штамма метилотрофных дрожжей *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) GS115-II-3 [17]. К числу его особенностей относились: (1) неоптимизированный уровень продукции целевого белка; (2) ограничения на коммерческое использование, связанные с применением патентованной системы экспрессии; (3) ограничения на применение продукта, производимого в клетках штамма, сконструированного с использованием гена устойчивости к антибиотику зеоцину.

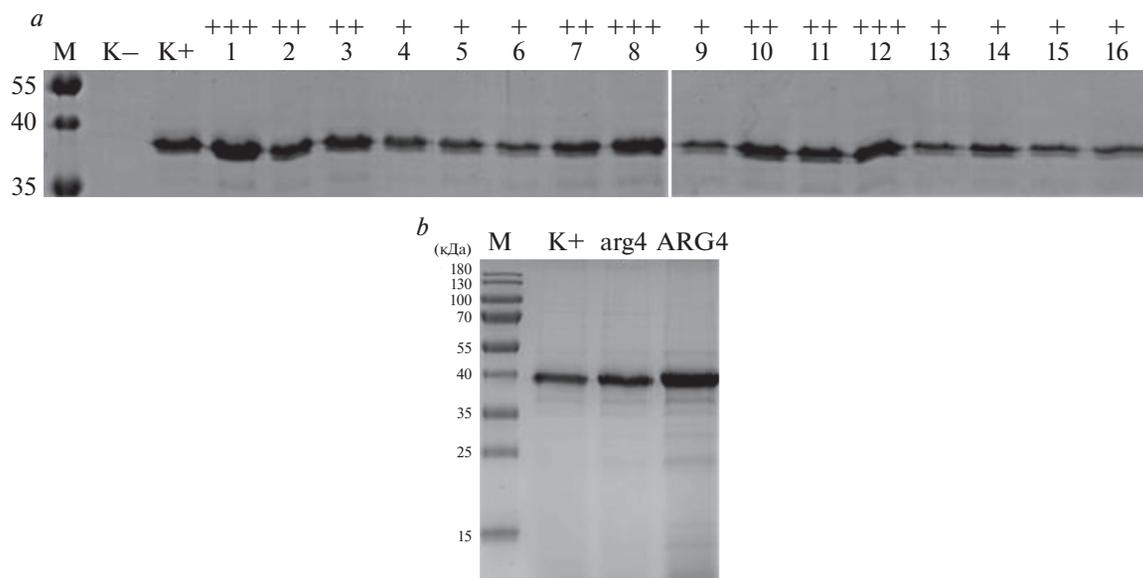
Для того чтобы преодолеть эти ограничения и улучшить биосинтетические характеристики штамма-продуцента представлялось целесообразным перенести биосинтез целевого белка на другую платформу. Ранее было показано, что альтернативой *K. phaffii* (*P. pastoris*) может служить система экспрессии на основе дрожжей *K. kurtzmanii*, во многих случаях обеспечивающая более высокие характеристики продуцентов [14, 15].

С целью разработки альтернативного штамма-продуцента было проведено клонирование структурного гена прокатепсина grTcCathL из коммерческого вектора pPICZalphaA (Invitrogen, [17]) в лабораторные векторы pRH727T2 и pRA7272, пригодные для трансформации реципиентных штаммов *K. kurtzmanii*. В результате были сконструированы 3 целевых плазмиды, pRH727T2-grTcCathL, pRH727T2-grTcCathL(3) и pRA7272-grTcCathL(2), содержавшие 1, 3 и 2 копии целевой кассеты экспрессии, соответственно (рис. 1).

Контрольный однокопийный штамм-продуцент grTcCathL, названный K+, был получен путем трансформации клеток реципиентного штамма *K. kurtzmanii* Y727 his4Δ плазмидой pRH727T2-grTcCathL, содержавшей одну копию целевой кассеты экспрессии. Как показал анализ секреции, штамм K+ является чрезвычайно эффективным продуцентом рекомбинантного прокатепсина grTcCathL (рис. 2, штамм K+), подобно ранее описанному штамму *K. phaffii* (*P. pastoris*) [17]. Согласно денситометрической оценке в условиях культивирования в колбах на среде комплексного состава уровень секреции целевого белка grTcCathL клетками штамма K+ превышал 200 мг/л. На электрофореграмме целевой белок присутствовал в составе двух полос близкого размера, что не исключало его частичной деградации (рис. 2a).

Многокопийный продуцент рекомбинантного прокатепсина grTcCathL был получен путем последовательной трансформации клеток реципиентного штамма *K. kurtzmanii* Y724 his4Δ arg4Δ плазмидами pRH727T2-grTcCathL(3) и pRA7272-grTcCathL(2), сопровождавшейся селекцией наиболее продуктивных трансформантов. На первом этапе клетки реципиентного штамма трансформировали вектором pRH727T2-grTcCathL(3), содержавшим 3 копии целевой кассеты экспрессии (рис. 1c). Скрининг 16 независимо отобранных трансформантов показал, что полученные клоны дифференцировались в соответствии с тремя уровнями продукции grTcCathL: низким (8 клонов), средним (5 клонов) и высоким (3 клон). При этом между группами с низкой (+) и высокой (+++) продукцией наблюдалась не менее, чем двукратная разница в уровне секреции прокатепсина, а штаммы со среднем уровнем продукции (++) секретировали количество прокатепсина, сравнимое с контрольным однокопийным продуцентом K+ (рис. 2a).

В соответствии с опытом разработки продуцентов других белков представлялось наиболее вероятным, что разные уровни секреции прокатепсина определялись различиями в количестве копий целевой кассеты, интегрированных в геном дрожжей. Рекомбинация, обеспечивавшая интеграцию плазмидных ДНК, содержавших 3 идентичные копии целевой кассеты, могла приводить



**Рис. 2.** (a) Скрининг производных штамма *K. kurtzmanii* Y727 his4Δ arg4Δ, трансформированных плазмидой рРН727Т2-гpTcCathL(3). Указаны номера трансформантов и оценочные уровни секреции прокатепсина. (b) Анализ действия ауксотрофной мутации arg4Δ. На дорожки наносили образцы КЖ, полученные при культивировании штамма K+, трансформанта № 1, ауксотрофного по аргинину (arg4), и его производного, трансформированного плазмидой, содержащей ген ARG4 без дополнительных копий гена гpTcCathL (ARG4). М – маркеры молекулярного веса (кДа), К– – реципиентный штамм; K+ – контрольный однокопийный трансформант *K. kurtzmanii* Y727his4Δ/[pРН727Т2-гpTcCathL]. На гель наносили по 5 мкл КЖ.

**Fig. 2.** (a) Screening of *K. kurtzmanii* Y727 his4Δ arg4Δ strain derivatives transformed by the plasmid rRN727T2-rpTcCathL(3). Transformant numbers and estimated levels of procathepsin secretion are indicated. (b) Analysis of the effect of the auxotrophic mutation arg4Δ. CM samples obtained during cultivation of strain K+, transformant No. 1, auxotrophic in arginine (arg4), and its derivative transformed by a plasmid containing the ARG4 gene without additional copies of the rpTcCathL (ARG4) gene were applied to the tracks. M – markers of molecular weight (kDa), K– – recipient strain; K+ – control single-copy transformant *K. kurtzmanii* Y727his4Δ/[rRN727T2-rpTcCathL]. 5 μL of CM were applied to the gel.

к получению трансформантов, содержащих 1, 2, 3 или более копий гена гpTcCathL. При этом, в отличие от контрольного прототрофного штамма K+ полученные трансформанты оставались ауксотрофными по аргинину, что, как оказалось, негативно влияло на уровень секреции прокатепсина. Как было показано, комплементация ауксотрофной мутации arg4Δ геном ARG4, обеспечившая превращение одного из трансформантов в прототрофный штамм-продуцент без изменения копийности гена гpTcCathL, привела к значительному увеличению секреции прокатепсина (рис. 2b). Выявленный эффект позволял связать пониженный уровень секреции прокатепсина штаммами + и ++ с действием ауксотрофной мутации arg4Δ.

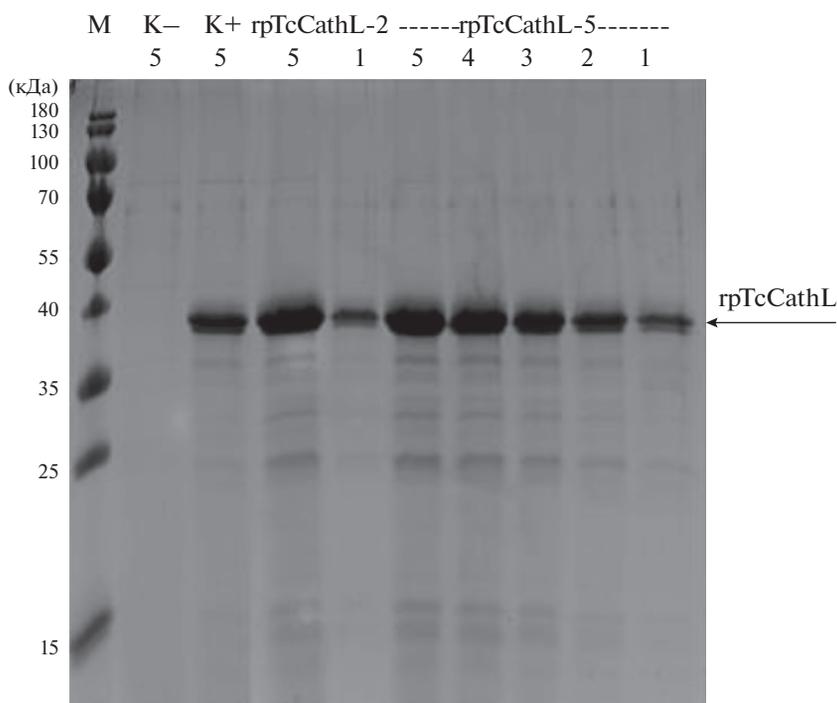
Повторное культивирование подтвердило генетическую природу различий в уровне секреции прокатепсина полученными трансформантами (данные не приведены). Для последующей трансформации был отобран клон № 1 (рис. 2a).

Далее была проведена дополнительная трансформация выбранного клона №1 плазмидой рРА7272-гpTcCathL(2), содержащей две копии гена гpTcCathL. Как показал скрининг 30 новых трансформантов, все они характеризовались по-

вышенным уровнем секреции катепсина относительно реципиентного штамма и не имели заметных отличий друг от друга (данные не приведены). В этой связи можно предположить, что на этапе получения клона №1 был достигнут предел секреторных возможностей дрожжей и дальнейшее увеличение числа копий кассеты в клетках новых трансформантов уже не вызывало улучшения секреции прокатепсина. Для последующих исследований случайным образом были отобраны два прототрофных трансформанта, содержащих 5 копий гена гpTcCathL, названные гpTcCathL-2 и гpTcCathL-5.

Как показал их дополнительный анализ, штаммы гpTcCathL-2 и гpTcCathL-5 обладали сходным уровнем секреции и продуцировали примерно в 2.5 раза больше прокатепсина по сравнению с однокопийным контрольным штаммом K+ (рис. 3).

Эффективность полученных препаратов также оценивали сравнением ферментативной активности зрелых катепсинов, выделенных из КЖ однокопийного гpTcCathL1, пятикопийного гpTcCathL5 (рис. 3) штаммов и продуцента *K. phaffii* (Pichia pastoris) GS115-II-3 [17]. Равные аликвоты КЖ, содержащих прокатепсин, были частично



**Рис. 3.** Сравнительный анализ секреции рекомбинантного прокатепсина клетками прототрофных штаммов-производителей K<sup>+</sup>, rpTcCathL-2 и rpTcCathL-5. Над дорожками указан объем образцов КЖ (мкл), нанесенных на гель. Видно, что 5 мкл КЖ штамма K<sup>+</sup> и 2 мкл КЖ штамма rpTcCathL-5 содержало сходное количество целевого белка.

**Fig. 3.** Comparative analysis of recombinant procathepsin secretion by cells of prototrophic K<sup>+</sup>, rpTcCathL-2 and rpTcCathL-5 producing strains. Above the tracks, the volume of CM samples (μL) applied to the gel is indicated. It can be seen that 5 μL CM of the K<sup>+</sup> strain and 2 μL CM of the rtctcl-5 strain contained a similar amount of the target protein.

очищены осаждением сульфатом аммония. Полученные препараты профермента были подвергнуты автопроцессингу при pH 4.0 как описано в [17]. По завершении процессинга в препаратах была измерена активность по селективному дипептидному *n*-нитроанилидному субстрату Glp-Phe-Gln-pNA (табл. 1). Согласно полученным результатам, препарат rpTcCathL-5 содержал в 2.1 раза больше единиц активности чем препарат rpTcCathL-K<sup>+</sup> и в 2.7 раза больше, чем rpTcCathL1, что соответствует оценке количества секретированного белка по данным SDS-ПААГ (рис. 3).

#### *Влияние условий культивирования дрожжей на секрецию rpTcCathL*

Анализ полученных данных подтвердил, что условия, выбранные для лабораторного культивирования, обеспечили эффективный биосинтез и секрецию рекомбинантного прокатепсина rpTcCathL (рис. 2 и 3). Вместе с тем, очевидно, что эти условия, включающие использование среды комплексного состава, не подходили для масштабированного применения. В этой связи с целью определения роли и влияния отдельных компонентов среды культивирования дрожжей на секрецию rpTcCathL был предпринят систематиче-

ский анализ, при котором спектр исследуемых факторов был расширен. К нему были отнесены комплексные компоненты, пептон и дрожжевой экстракт, а также буфер, используемый для стабилизации pH (табл. 2).

В ходе анализа штамм rpTcCathL-5 культивировали с использованием ротационного шейкера на средах различного состава, обеспечивавших индукцию метанолом в течение 72 ч. Оценивали ростовые показатели дрожжей, изменение pH среды,

**Таблица 1.** Оценка содержания рекомбинантного прокатепсина в КЖ штаммов-производителей K<sup>+</sup>, rpTcCathL1 и rpTcCathL5 путем измерения активности зрелых катепсинов по субстрату Glp-Phe-Gln-pNA

**Table 1.** Quantify of recombinant procathepsin in the CM of K<sup>+</sup>, rpTcCathL1 and rpTcCathL5 producing strains by measuring the activity of mature cathepsins on the Glp-Phe-Gln-pNA substrate with

Штамм, источник прокатепсина	Активность зрелого катепсина в пробе, ЕД/мин мл
rpTcCathLK <sup>+</sup>	1.74
rpTcCathL1	1.39
rpTcCathL5	3.74

**Таблица 2.** Влияние компонентов среды культивирования на ростовые показатели штамма рpTcCathL-5  
**Table 2.** Influence of the components of the cultivation medium on the growth indicators of the рpTcCathL-5 strain

Образец №	Компоненты среды культивирования				Конечные показатели культуры дрожжей	
	YNB*	дрожжевой экстракт, %	пептон, %	100 мМ калий-фосфатный буфер	pH	OD <sub>600</sub>
1	–	–	–	pH 6.0	2.6	27.2
2	+	1	–		5.4	38.8
3	–	–	2		5.2	40.1
4	–	1	2		6.9	49.6
5	–	–	–	pH 8.0	5.7	28.5
6	+	1	–		6.7	38.4
7	–	–	2		6.5	37.5
8	–	1	2		7.8	49.2

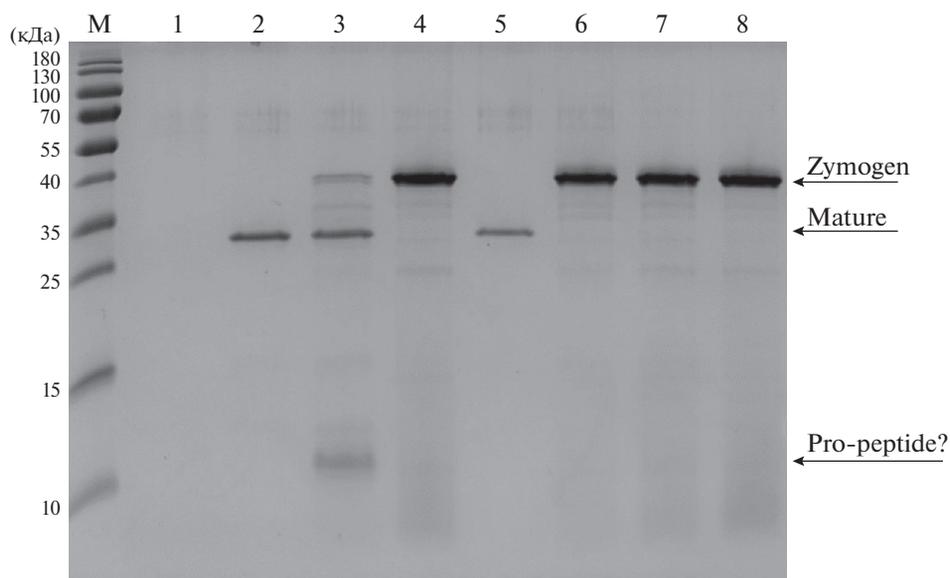
\* *Примечание:* 0.67 г/100 мл, включая сульфат аммония.

\* *Note:* 0.67 g/100 mL, including ammonium sulfate.

а также уровень секреции целевого белка и его состояние.

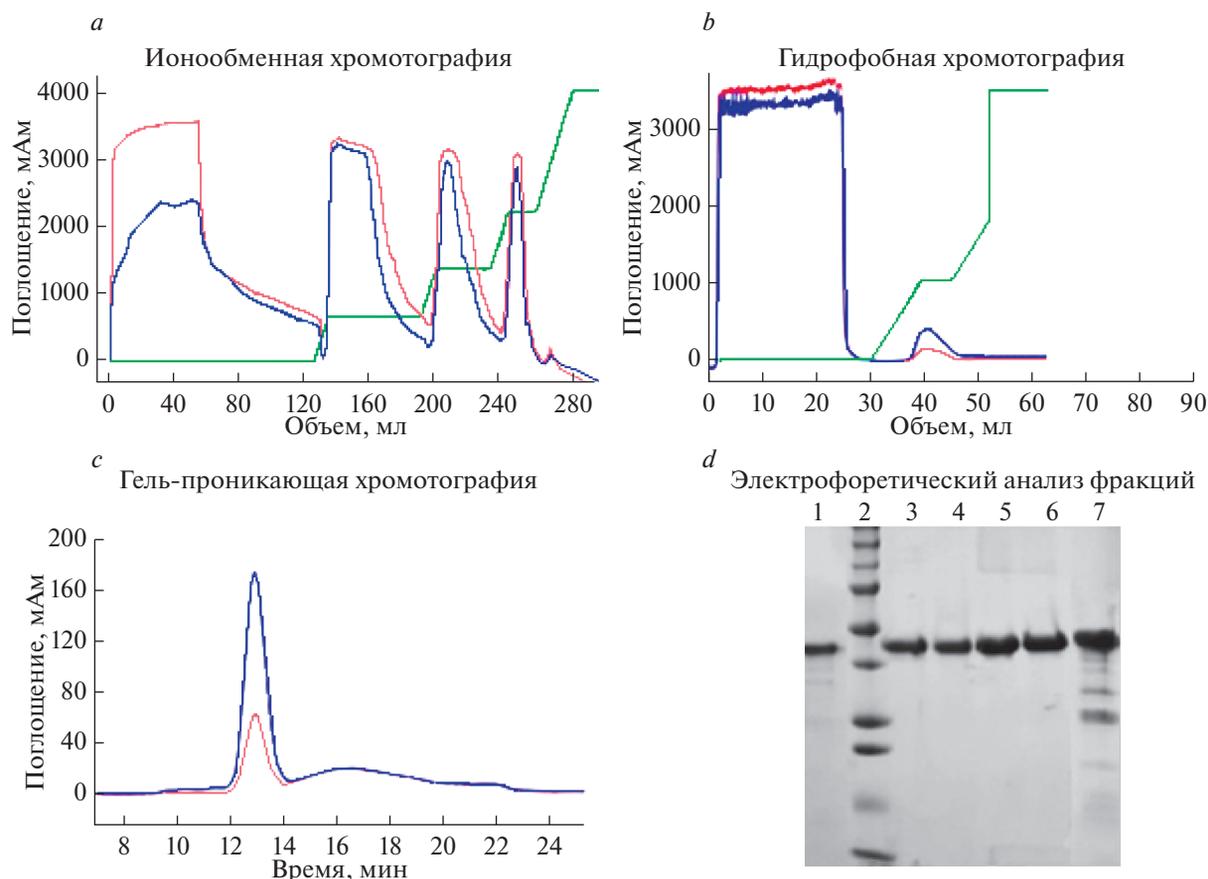
Согласно полученным данным (табл. 2, рис. 4), в отсутствие органических компонентов калий-фосфатный буфер pH 6.0 не обеспечивал стабилизацию pH, что привело к сильнейшему закислению среды и препятствовало хоть сколько-нибудь заметному накоплению целевого продукта

(образец 1). Калий-фосфатный буфер pH 8.0 более эффективно противостоял закислению среды, что, хотя и не сказалось на росте дрожжей, но обеспечило секрецию/накопление целевого белка (образец 5). Внесение в среду органических компонентов, пептона или дрожжевого экстракта, обеспечило стабилизацию pH и увеличение продукции рpTcCathL (образцы 2–4 и 6–8). При этом в кис-



**Рис. 4.** Влияние условий культивирования дрожжей на уровень секреции и состояние целевого белка рpTcCathL. В соответствии с молекулярным весом обнаруженные на геле полосы были отнесены к следующим формам целевого белка: предшественник (зимоген), зрелый белок и про-пептид. Дорожки геля обозначены в соответствии с номерами образцов в табл. 1.

**Fig. 4.** Influence of yeast cultivation conditions on the level of secretion and the state of the target protein рpTcCathL. According to the molecular weight, the bands found on the gel were assigned to the following forms of the target protein: precursor (zymogen), mature protein (mature) and pro-peptide (pro-peptide). The gel tracks are indicated according to the sample numbers in table 1.



**Рис. 5.** (a) Типичная картина хроматографической очистки белка rpTcCathL на Q-сефарозе; (b) типичная картина хроматографической очистки белка rpTcCathL на Phe-сефарозе; (c) результат контроля качества конечного препарата гель-проникающей хроматографией и (d) электрофоретический анализ фракций, содержащих профермент на различных стадиях очистки, где 1 – осветленная культуральная жидкость, 2 – маркеры молекулярного веса (BioRad, 1610373), 3 – элюат после ионообменной хроматографии, 4 – супернатант после осаждения сульфатом аммония, 5 – элюат после гидрофобной хроматографии, 6 – обессоленный образец профермента (0,28 мг/мл), 7 – концентрат (1,68 мг/мл).  
**Fig. 5.** (a) Typical chromatographic purification of rpTcCathL protein by Q-sepharose; (b) typical chromatographic purification of rpTcCathL protein by Phe-sepharose; (c) result of quality control of the final preparation by size-exclusion chromatography and (d) electrophoretic analysis of fractions containing proenzyme at various stages of purification, where 1 – clarified culture medium, 2 – molecular weight markers (BioRad, 1610373), 3 – eluate after ion exchange chromatography, 4 – supernatant after precipitation with ammonium sulfate, 5 – eluate after hydrophobic chromatography, 6 – desalinated proenzyme sample (0.28 mg/mL), 7 – concentrate (1.68 mg/mL).

лых условиях  $pH \leq 5.7$  (образцы 2, 3 и 5) целевой белок rpTcCathL, вероятно, подвергся автопроцессингу (созреванию), причем в образце 3 сохранились все три его формы: зимоген, зрелый белок и про-область (рис. 4). Кроме того, эти условия провоцировали не только укорочение целевого белка, но и уменьшение его количества в образце (рис. 4). По своей природе, оба эффекта могут объясняться автопроцессингом и автопротеолизом белка, соответственно. В образцах КЖ с более высоким  $pH \geq 6.5$  (образцы 4, 6, 7 и 8) секретированный белок сохранял форму зимогена (рис. 4).

Таким образом, согласно данным проведенного анализа, наиболее существенным фактором, определявшим не только уровень накопления целевого белка rpTcCathL, но и его состояние (зимо-

ген или зрелый белок), являлся  $pH$  среды. Компоненты среды, пептон и дрожжевой экстракт, играли вспомогательную роль, участвуя в стабилизации  $pH$  и/или, возможно, в стимулировании секреции целевого белка.

Имеющиеся в литературе данные о методах получения рекомбинантных препаратов пептидаз свидетельствуют о частом использовании бактериальной экспрессионной системы на основе разных штаммов *Escherichia coli* как наиболее дешевой и удобной [18–20]. Недостатком этой системы является то, что целевой белок может секретироваться в нерастворимой форме. В результате получение препарата включает стадию рефолдинга нерастворимого белка, что усложняет процедуру и снижает активность целевого белка несмотря на

**Таблица 3.** Очистка рекомбинантного прокатепсина рТсCathL из культуральной жидкости дрожжей *K. Kurtzmanii*  
**Table 3.** Purification of recombinant procathepsin рТсCathL from the culture medium of yeast *K. kurtzmanii*

Стадии очистки	Объем, мл	Концентрация суммарного белка, мг/мл	Выход целевого белка		Удельная активность, Ед/мг мин
			мг	%	
Осветленная КЖ	27	1.59	43	100	Не измеряли
Ионообменная хроматография на колонке HiTrapQ	10	3.44	34.4	80.0	Не измеряли
Супернатант после осаждения 1М сульфатом аммония	11	3.03	33.3	77.5	Не измеряли
Гидрофобная хроматография на колонке HiTrapPhenyl	10	1.38	13.8	32.1	Не измеряли
Ультрадиафильтрация	47	0.28	13.2	30.7	2.14
Процессинг	53	0.14	7.4	17.3	84.3

достаточно высокий выход, до 180 мг/л [19, 20]. В сравнительных опытах в системах *E. coli*, где целевой белок был получен в растворимой форме, его выходы были ниже в 10 раз, но препарат обладал высокой ферментативной активностью [20].

Альтернативным способом получения рекомбинантных пептидаз является экспрессия генов в штаммах дрожжей, преимущественно *Komagataella (Pichia) pastoris*. В исследовании [20] Гороховец и соавторы сравнивали дрожжевую систему экспрессии с бактериальной. В первой использовали среду для культивирования с рН 6,0 и несмотря на достаточно высокие выходы белка— до 300 мг/л — получить высокоактивный препарат не удалось в связи с преждевременным процессингом растительной цистеиновой пептидазы в процессе культивирования.

Активный автопроцессинг фермента в ходе культивирования и последующей очистки белка наблюдали и другие авторы при получении в системе *K. pastoris* рекомбинантных прокатепсинов L насекомых: кукурузного жука *Diabrotica virgifera* (выход белка 0.2 мг/л) [21], мясной мухи *Sarcophaga peregrine* (до 12 мг/л) [22] и пшеничной мухи *Delia coarctata* (20 мг/л) [23].

#### Выделение и очистка рекомбинантного прокатепсина

На основании проведенного анализа наработку рекомбинантного прокатепсина для последующей очистки проводили на среде комплексного состава, доведенной до рН 8.0 добавлением буфера, и обеспечивавшей эффективный биосинтез и высокую стабильность зимогенной формы белка (табл. 2, рис. 4, образец 8).

Описанный ранее рекомбинантный прокатепсин рТсCathL1, полученный с использованием продуцента *K. phaffii (Pichia pastoris)* GS115-II-3 очищали осаждением сульфатом аммония с последу-

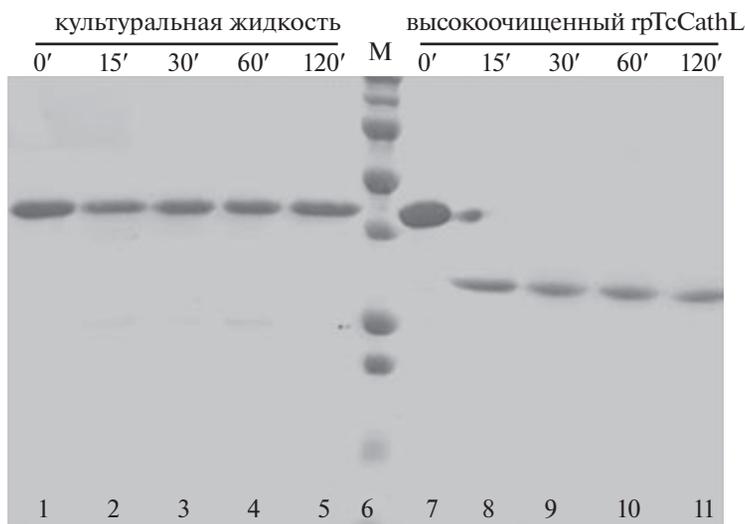
ющим диализом, при этом выход фермента составил 34% [17].

Такая схема получения целевого белка требовала существенной доработки, особенно актуальной в случае использования рТсCathL предназначенного или планируемого для создания терапевтического препарата, например, для лечения целиакии.

В настоящей работе наши основные усилия были сосредоточены на использовании комбинации анионообменной и гидрофобной хроматографии для повышения степени очистки рекомбинантного прокатепсина (см. раздел Условия эксперимента). В частности, на первой стадии для извлечения рекомбинантного прокатепсина из осветленной КЖ, полученной после осаждения клеток дрожжей, применяли анионообменную хроматографию с использованием колонки HiTrapQ (рис. 5a). Несмотря на довольно высокий выход электрофоретически чистого белка (80%) (рис. 5d, табл. 3), в элюате визуально наблюдалось присутствие остаточного пигмента из дрожжевой среды. Дополнительную очистку белка проводили гидрофобной хроматографией на колонке HiTrap Phenyl HP., выход белка на этой стадии составил около 40% (суммарный выход — 32%, табл. 3). Согласно хроматограмме, приведенной на рис. 5b, пигмент и другие примеси не связывались с сорбентом и выходили в пророске, что позволило очистить препарат от большого количества небелковых примесей.

На последней стадии для обессоливания раствора прокатепсина использовали ультрадиафильтрацию. В результате выход очищенного прокатепсина составил чуть более 30%, чистота конечного препарата превышала 95% (рис. 5c—5d, табл. 3).

Следует добавить, что одной из существенных проблем, потребовавших решения, стала деградация и/или агрегация (выпадение в осадок) целевого белка на финальных стадиях очистки и/или



**Рис. 6.** Зависимость скорости автопроцессинга профермента rpTcCathL от чистоты препарата.  
**Fig. 6.** Dependence of the rate of auto-processing of the rpTcCathL proenzyme on the purity of the drug.

хранения. Как оказалось, для ее эффективного решения следовало понизить концентрацию белка на конечных стадиях очистки до уровня не выше 0.5 мг/мл, оптимально – 0.3 мг/мл. В этом случае препараты высокоочищенного белка сохраняли свои характеристики без детектируемых изменений при температуре +4°C на протяжении, минимум, 14 сут (данные не приведены).

#### Активация высокоочищенного рекомбинантного прокатепсина L

Как показало предыдущее исследование, активация прокатепсина L может осуществляться путем автокаталитического процессинга при снижении pH до уровня 4.0–4.5 [17]. Эти условия были использованы для получения образца высокоочищенного активированного катепсина L. В результате полная активация высокоочищенного профермента потребовала максимум 30 мин инкубации при температуре 37°C (рис. 6). При этом удельная активность фермента возросла более, чем в 40 раз (табл. 3). В то же время в аналогичном эксперименте с использованием образца КЖ, содержащего неочищенный профермент, в течение 120 мин активации не наблюдалось вовсе (рис. 6), а активация профермента, полученного с использованием неоптимизированной схемы очистки, занимала промежуточное время 40–60 мин [17]. Оценивая совокупность приведенных данных, можно заключить, что, вероятно, на скорость автокаталитического процессинга профермента решающее влияние оказывала чистота исследуемого препарата. При этом наиболее очищенный препарат требовал наименьшего времени активации.

При определении стабильности образца высокоочищенного активированного фермента при температуре +4°C было установлено, что, пребывая в условиях автокаталитического процессинга, препарат белка с концентрацией 0.14 мг/мл сохранял свои характеристики без детектируемых изменений на протяжении, минимум, двух недель (данные не приведены).

Таким образом, в результате проведенных исследований были разработаны основы технологии получения и хранения рекомбинантных препаратов высокоочищенного главного пищеварительного катепсина *L. T. castaneum* (NP\_001164001) в форме профермента и зрелого катепсина L.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rawlings N.D., Barrett A.J., Thomas P.D., Huang X., Bateman A., Finn R.D. 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, D624–D632. <https://www.ebi.ac.uk/merops/>.
2. Grzonka Z., Kasprzykowski F., Wiczak W. Cysteine Proteases. 2007. In: *Industrial Enzymes; structure, function and applications*. J. Polaina, A.P. MacCabe (eds). Dordrecht: Springer, 2007, 181–195. [https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0\\_11](https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_11)
3. Arshad Z.I.M., Amid A., Yusof F., Ahmad K., Loke S.P. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98(17), 7283–7297. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5889-y>
4. Jáuregui K.M.G., Cabrera J.C.C., Cenicerós E.P.S., Hernández J.L.M. A new formulated stable papain-pectin aerosol spray for skin wound healing. *Biotechnol.*

- ogy and Bioprocess Engineering, 2009, 14(4), 450–456. <https://doi.org/10.1007/S12257-008-0268-0>
5. Rani A., Venkatesu P. Insights into the interactions between enzyme and co-solvents: Stability and activity of stem bromelain. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015, 73, 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.068>
  6. Turk V., Stroka V., Vasiljeva O., Renko M., Sun T., Turk B., Turk D. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, 1824, 68–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.002>
  7. Vasiljeva O., Reinheckel T., Peters C., Turk D., Turk V., Turk B. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr. Pharm. Des.*, 2007, 13, 385–401. <https://doi.org/10.2174/138161207780162962>
  8. Dvoryakova E.A., Vinokurov K.S., Tereshchenkova V.F., Dunaevsky Y.E., Belozersky M. A., Oppert B., Filippova I.Y., Elpidina E.N. Primary digestive cathepsins L of *Tribolium castaneum* larvae: proteomic identification, properties, comparison with human lysosomal cathepsin L. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2022, 140, 103679. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103679>
  9. Goptar I.A., Semashko T.A., Danilenko S.A., Lyso-gorskaya E.N., Oksenoit E.S., Zhuzhikov D.P., Belozersky M.A., Dunaevsky Y.E., Oppert B., Filippova I.Yu., Elpidina E.N. Cysteine digestive peptidases function as post-glutamine cleaving enzymes in tenebrionid stored-product pests. *Comp Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 2012, 161B, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.10.005>
  10. Filippova I.Y., Dvoryakova E.A., Sokolenko N.I., Simonyan T.R., Tereshchenkova V.F., Zhiganov N.I., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A., Oppert B., Elpidina E.N. New glutamine-containing substrates for the assay of cysteine peptidases from the C1papain family. *Front. Mol. Biosci.*, 2020, 7, 578758. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.578758>
  11. Турин О.В., Козлов Д.Г., Чеперегин С.Э., Губайдаллин И.И., Ефремов Б.Д., Клебанов Ф.А. Применение штамма дрожжей *Komagataella pastoris* в качестве реципиента для конструирования продуцентов целевого белка. Патент RU 2522479, опубл. 20.07.2014, бюл. № 20.
  12. Naumov G.I., Naumova E.S., Tyurin O.V., Kozlov D.G. *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. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9956-7>
  13. Gasser B., Prielhofer R., Marx H., Maurer M., Nocon J., Steiger M., Puxbaum V., Sauer M., Mattanovich D. *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research. *Future Microbiol.*, 2013, 8(2), 191–208. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.133>
  14. Матвеева А.Ю., Губайдуллин И.И., Федоров А.С., Козлов Д.Г. Оптимизация экспрессии гена 1.3–1.4 β-глюканазы *Rhizomucor miehei* в дрожжах *Komagataella kurtzmanii*. *Биотехнология*, 2019, 35(5), 3–11. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-5-3-11>
  15. Gorbunov A.A., Akentyev F.I., Gubaidullin I.I., Zhiganov N.I., Tereshchenkova V.F., Elpidina E.N., Kozlov D.G. Biosynthesis and secretion of serine peptidase SerP38 from *Tenebrio molitor* in the yeast *Komagataella kurtzmanii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2021, 57(9), 11–17. <https://doi.org/10.1134/S0003683821090039>
  16. Kozlov D.G., Yagudin T.A. Antibody fragments may be incorrectly processed in the yeast *Pichia pastoris*. *Bio-technol. Lett.*, 2008, 30(9), 1661–1663. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9739-9>
  17. Dvoryakova E.A., Klimova M.A., Simonyan T.R., Dombrovsky I.A., Serebryakova M.V., Tereshchenkova V.F., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A., Filippova I.Y., Elpidina E.N. Recombinant cathepsin L of *Tribolium castaneum* and its potential in hydrolysis of immunogenic gliadin peptides. Submitted to *Int. J. Mol. Sci., Special Issue “Peptidases: Role and Function in Health and Disease”*, 2022.
  18. Beton D., Guzzo C.R., Ribeiro A.F., Farah C.S., Terra W.R. The 3D structure and function of digestive cathepsin L-like proteinases of *Tenebrio molitor* larval midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2012, 42, 655–664. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.04.010>
  19. Savateeva L.V., Gorokhovets N.V., Makarov V.A., Serebryakova M.V., Solovyev A.G., Morozov S.Y., Reddy V.P., Zernii E.Y., Zamyatin A.A. Jr, Aliev G. Glutenase and collagenase activities of wheat cysteine protease triticain-α: Feasibility for enzymatic therapy assays. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2015, 62, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.03.001>
  20. Gorokhovets N.V., Makarov V.A., Petushkova A.I., Prokopets O.S., Rubtsov M.A., Savateeva L.V., Zernii E.Y., Zamyatin A.A. Jr. Rational Design of Recombinant Papain-Like Cysteine Protease: Optimal Domain Structure and Expression Conditions for Wheat-Derived Enzyme Triticain-α. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, 18, 1395. <https://doi.org/10.3390/ijms18071395>
  21. Bown D.P., Wilkinson H.S., Jongmsa V.A., Gatehouse J. Characterization of cysteine proteinases responsible for digestive proteolysis in guts of larval western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*) by expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2004, 34(4), 305–320. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.11.005>
  22. Philip J.M.D., Fitches E., Harrison R.L., Bonning B., Gatehouse J.A. Characterization of functional and insecticidal properties of a recombinant cathepsin L-like proteinase from flesh fly (*Sarcophaga peregrina*), which plays a role in differentiation of imaginal discs, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2007, 37(6), 589–600. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.03.003>
  23. Pyati P.S., Bell H.A., Fitches E., Price D.R.G., Gatehouse A.M.R., Gatehouse J.A. Cathepsin L-like cysteine proteinase (DcCathL) from *Delia coarctata* (wheat bulb fly): basis of insecticidal activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2009, 39(8), 535–546. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.05.003>

**Development of the Fundamentals of Technology for the Production  
of *Tribolium castaneum* Recombinant Cathepsin L  
in the *Komagataella kurtzmanii* Yeast**

**A. V. Serkina<sup>a</sup>, I. I. Gubaidullin<sup>a, b</sup>, F. I. Akentiev<sup>a, b</sup>, I. A. Dombrovskii<sup>c</sup>,  
I. Yu. Filippova<sup>c</sup>, E. N. Elpidina<sup>d</sup>, D. G. Kozlov<sup>a</sup>, and N. V. Bulushova<sup>a, #</sup>**

<sup>a</sup>*Kurchatov Institute National Research Center, 123182 Moscow Russia*

<sup>b</sup>*Kurchatov Center for Genome Research, Kurchatov Institute—GOSNIIGENETIKA NRC, Moscow, 117545 Russia*

<sup>c</sup>*Faculty of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

<sup>d</sup>*A.N. Belozersky Institute of Physicochemical Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: Bulushova\_NV@rrcki.ru*

**Abstract**—Based on the *Komagataella kurtzmanii* yeast, a strain producing *Tribolium castaneum* recombinant procathepsin (rpTcCathL) has been obtained; this strain provided biosynthesis and secretion of at least 0.5 g/L of the target protein as a result of cultivation in flasks on a medium of complex composition. It was determined that the pH of the yeast culture medium (pH  $\geq$  6.5) is the key factor influencing the biosynthesis and accumulation of procathepsin. A new chromatographic purification scheme was developed, which allows obtaining recombinant procathepsin with a yield of about 30% and a purity of over 95%. It was shown that complete autocatalytic activation of the pro-enzyme is achieved within no more than 30 min at a temperature of 37°C and pH 4.0–4.5. The resulting recombinant cathepsin and activated cathepsin at a concentration of 0.5 mg/mL and below could be stored without detectable changes at a temperature of 4°C for at least two weeks. Thus, the conducted research made it possible to develop the fundamentals of the technology for obtaining and storing recombinant preparations of the highly purified major digestive cathepsin L from *T. castaneum* in the form of a pro-enzyme and mature cathepsin L.

**Keywords:** recombinant enzymes, producer strain, isolation and purification, digestive cathepsin L, *Tribolium castaneum*, celiac disease