

УДК 577.15.08;577.152.34

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИ АКТИВНОГО ГОМОЛОГА СЕРИНОВОЙ ПЕПТИДАЗЫ SerPH122 *Tenebrio molitor*

© 2021 г. В. Ф. Терещенкова¹, Н. И. Жиганов², Ф. И. Акентьев^{3,4}, И. И. Губайдуллин^{3,4}, Д. Г. Козлов⁴, Н. В. Беляева², И. Ю. Филиппова¹, Е. Н. Элпидина⁵, *

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991 Россия

³НИИЦ “Курчатовский институт” – ГосНИИгенетика, Курчатовский геномный центр, Москва, 117545 Россия

⁴Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

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

*e-mail: elp@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 02.04.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 22.04.2021 г.

Псевдоферменты – гомологи активных ферментов, имеют аминокислотные замены в активном центре и в связи с этим обычно не обладают ферментативной активностью. В данной работе получен рекомбинантный пробелок (proSerPH122) гомолога сериновых пептидаз семейства S1 мучного хрущака (*Tenebrio molitor*) в штамме-продуценте дрожжей *Komagataella kurtzmanii*. В процессе секреции в дрожжах целевой белок, содержащий His₆-tag, продуцировался в гликозилированной форме. Изучение свойств проводили параллельно для гликозилированной и дегликозилированной форм. Для изучения энзиматических свойств полученный в виде пробелка гомолог proSerPH122 с заменой Ser активного центра на Thr процессировали предварительно трипсином. Показано, что процессированный зрелый гомолог SerPH122 обладал невысокой, но достоверно детектируемой активностью по хромогенному субстрату Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, и эта активность не зависела от уровня его гликозилирования.

Ключевые слова: псевдоферменты, псевдопептидазы, гомолог сериновой пептидазы семейства S1, получение рекомбинантного белка, *Tenebrio molitor*

DOI: 10.31857/S0555109921050172

Сериновые пептидазы семейства S1 химотрипсина по классификации MEROPS [1] представляют обширную группу протеолитических ферментов. Родоначальником семейства является химотрипсин, активный центр которого составляет каталитическая триада аминокислотных остатков His57-Asp102-Ser195 (нумерация во введении дана по химотрипсину *A Bos taurus*, NCBI ID XP_003587247 [2]). Субстратная специфичность сериновых пептидаз обусловлена аминокислотными остатками S1 субсайта связывания, сформированного 189, 216 и 226 остатками [3, 4]. В зависимости от состава S1-субсайта выделяют химотрипсина A/B (Ser-Gly-Gly), химотрипсина C (Ser-Gly-Val), трипсина (Asp-Gly-Gly), сериновые эластазы (Gly-Val-Ser/Thr), коллагеназы (Gly-Gly-Asp).

Подробный биоинформатический анализ последовательностей, широко используемый в последние годы, показал, что наряду с активными

ферментами, способными осуществлять катализ, существует целый ряд псевдоферментов, или псевдопептидаз, которые являются структурными гомологами ферментов, но содержат замены аминокислотных остатков активного центра, что приводит в большинстве случаев к полному отсутствию каталитической активности [5] или значительному ее снижению [6]. Данных о функциях многочисленной группы псевдоферментов в настоящее время очень мало, и они касаются, в основном, их биоинформатической характеристики [7, 8]. Псевдоферменты функционируют часто как компоненты сложных комплексов. Считается, что они могут принимать участие в регуляции своих каталитически-активных гомологов, выступая в качестве белков-партнеров, участвовать в регуляции метаболических и сигнальных путей, часто ассоциированных с патологическими состояниями, что делает их потенциальными ми-

шениями для разработки терапевтических агентов наряду с активными ферментами [9].

Растущая важность и актуальность изучения псевдоферментов подчеркивается как широким спектром процессов, в которых они участвуют, так и их многочисленностью. По мере выявления большего числа псевдоферментов возрастает необходимость в понимании их структуры, филогенетических связей, функциональной роли.

Исследования последних лет свидетельствуют о том, что большое количество псевдоферментов характерно для насекомых. Так, в частности, у *Anopheles gambiae* и *Drosophila melanogaster*, а также и у многих других родственных видов было найдено большое количество как неактивных, так и активных трипсиноподобных сериновых пептидаз, причем эволюция неактивных пептидаз и их новые функции предположительно оказались выгодными для насекомых [7]. Примером такого взаимодействия может служить белок CASPS18, найденный у комара *Aedes aegypti* и являющийся регулятором своего активного паралога каспазы CASPS19 [10]. Это предположение можно распространить на другие организмы, в том числе и человека. В связи с этим, большой интерес для изучения спектра и свойств псевдопептидаз могут представлять собой насекомые семейства Tenebrionidae, в частности, *Tenebrio molitor*, являющееся хорошо изученной биохимической моделью благодаря своим крупным размерам.

Ранее в лаборатории был получен обширный транскриптом из кишечника личинок *T. molitor* [11], анализ которого позволил выявить SerPH122 (Serine Peptidase Homolog) – белок-гомолог сериновых пептидаз из семейства S1 химотрипсина. Для детальной характеристики свойств гомолога SerPH122, а также для определения природных молекул или субстратов, способных к специфическому взаимодействию с SerPH122, необходимо получить рекомбинантный препарат исследуемого белка. Ранее было показано [12, 13], что метило-трофные дрожжи *Komagataella kurtzmanii* представляют собой основу системы экспрессии, альтернативную *K. phaffii* (ранее *Pichia pastoris*) и могут осуществлять эффективный биосинтез и секрецию рекомбинантных ферментов.

Цель работы – конструирование штамма-продуцента рекомбинантного пробелка-гомолога proSerPH122 *T. molitor*, получение белка proSerPH122, очистка профермента, его дегликозилирование, процессинг пробелка и тестирование наличия протеолитической активности у зрелого белка.

МЕТОДИКА

Конструирование плазмид и штаммов. Фрагмент ДНК, кодирующий рекомбинантный пробелок-гомолог proSerPH122, получали с помощью

ПЦР-амплификации. Матрицей для амплификации служила плазида pAL-TA-31-1 (“Евроген”, Россия), содержащая кДНК пробелка-гомолога proSerPH122 (GenBank MW882981). ПЦР проводили с использованием ДНК-полимеразы Phusion (“Thermo Fisher Scientific”, США) и праймеров pNcoI (5'-tataccatggaaaagagatctaagcctggagctctataatt-3') и pXhoI (5'-taactcggagttaatggtgatgggatgatggggattgatgatgttctgat-3'). Помимо сайтов рестрикции *NcoI* и *XhoI* (подчеркнуты в составе соответствующих праймеров) в ходе ПЦР в состав амплифицированного фрагмента ДНК были введены дополнительные последовательности, удлинившие N-конец рекомбинантного пробелка proSerPH122 на остаток серина и C-конец – на пептид His₆-tag.

Амплифицированный фрагмент ДНК клонировали в вектор pPH727-AOX727 [14] по сайтам рестрикции *NcoI/XhoI* как описано ранее [13], в результате получили плазмиду pPH727-proSerPH122. Корректность последовательности структурного гена proSerPH122 в составе плазмиды pPH727-proSerPH122 подтверждена секвенированием. Регуляция экспрессии целевого гена находилась под контролем индуцируемого метанолом промотора гена *AOX1* штамма ВКПМ Y-727 *K. kurtzmanii* (pAOX727) [14], секрецию целевого белка направляла лидерная область artНН, как описано ранее [13]. В процессе клонирования и амплификации плазмиды pPH727-proSerPH122 использовали клетки Top10 *Escherichia coli* (“Invitrogen”, США). Культивировали при температуре 37°C на среде LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл.

Трансформацию клеток реципиентного штамма дрожжей *K. kurtzmanii* Y727his4Δ проводили по методике, описанной в работе [14]. Перед трансформацией интегрируемый фрагмент ДНК линеаризовали путем гидролиза плазмиды pPH727-proSerPH122 по рестрикционным сайтам *MluI*.

Для культивирования полученных трансформантов использовали среду YPGM следующего состава (%): дрожжевой экстракт – 1.0 (0207; “BioSpringer”, Франция), пептон соевый – 2.0 (P140; “Amresco”, США), глицерин – 0.5 (“Panreac”, Испания), метанол – 1.0 (техническая марка “А” ГОСТ 2222-95, Россия). Метанол вносили в среду до конечной концентрации 1% при засеве дрожжей и далее с периодичностью в 24 ч. Нарботку образцов культуральной жидкости (КЖ), содержащих белок proSerPH122, проводили в течение 72 ч при температуре 29°C с использованием ротационного шейкера со скоростью вращения 250 об./мин.

Электрофорез белков. Электрофорез белков КЖ трансформантов pPH727-proSerPH122 проводили в 15%-ном ПААГ в восстанавливающих условиях (ДДС-ПААГ) как описано ранее [13]. Использовали предокрашенные белковые марке-

ры “Thermo Fisher Scientific” (США). При подготовке образцов перед нанесением на гель белки концентрировали как описано ранее [15]. На дорожки наносили препараты, сконцентрированные из 100 мкл КЖ.

Очистка рекомбинантного пробелка proSerPH122 *T. molitor*. Очистку рекомбинантного пробелка из КЖ дрожжей проводили с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии, как описано ранее [13], с тем отличием, что перевод очищенного белка из буфера А в воду mQ осуществляли методом ультрафильтрации с использованием ультрафильтрационной ячейки (“Amicon”, США) и мембраны с порогом отсечения 3 кДа (Millipore, США). Непосредственно после обессоливания раствора белка чистоту препарата оценивали с помощью электрофореза в ПААГ с Na-ДДС. Концентрацию измеряли фотометрически при длине волны 280 нм на спектрофотометре NanoDrop 1000 (“Thermo Fisher Scientific”, США). Препарат замораживали в жидком азоте и лиофилизовали на приборе FreeZone (“Labconco”, США).

Дегликозилирование рекомбинантного пробелка proSerPH122 *T. molitor* с использованием эндогликозидазы-Н. Для реакции дегликозилирования использовали лиофилизованный препарат, полученный на предыдущем этапе. Дегликозилирование проводили с помощью эндогликозидазы Endo Н (“New England Biolabs”, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Обессоливание и перевод белка в воду mQ осуществляли методом ультрафильтрации, как описано выше, концентрацию измеряли фотометрически при длине волны 280 нм на спектрофотометре NanoDrop 1000. Препарат замораживали в жидком азоте и лиофилизовали на приборе FreeZone (“Labconco”, США).

Масс-спектрометрический анализ. Масс-спектрометрический анализ очищенного белка проводили на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре UltrafleXtreme (“Bruker Daltonics”, Германия), оснащенном 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”, США).

Биоинформатический анализ последовательности SerPH122 *T. molitor*. Полную аминокислотную последовательность белка SerPH122 *T. molitor*, полученную в результате трансляции кодирующей ее последовательности GenBank MW882981, выравнивали с родоначальником семейства S1 хисмотрипсином быка NCBI ID XP_003587247 с использованием сервера для множественного выравнивания последовательностей Clustal Omega [16]. Анализ и визуализацию активного центра и субстратсвязывающего субсайта проводили в Gene-

Doc [17]. Сигнальный пептид предсказывали на сервере SignalP-5.0 [18].

Процессинг пробелка proSerPH122 *T. molitor*. Для активации proSerPH122 лиофилизированные гликозилированный и дегликозилированный препараты пробелка растворяли до концентрации 15 мкг/мл в 0.1 М ацетатно-фосфатно-боратном универсальном буфере pH 7.9, добавляли раствор трипсина до конечной концентрации 0.25 мкг/мл и инкубировали в течение 60 мин при температуре 37°C в термостатируемом шкафу (“Binder”, Германия).

Определение ферментативной активности рекомбинантного гомолога SerPH122 *T. molitor*. Для тестирования ферментативной активности исходного пробелка и процессированного гомолога SerPH122 в качестве хромогенного субстрата использовали N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-(*n*-нитроанилид) – Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (“Bachem”, Швейцария). Реакцию и расчет ферментативной активности проводили по опубликованной ранее методике [19]. Измерение активности проводили при pH 7.9, и 5.6 в 0.1 М ацетатно-фосфатно-боратном универсальном буфере [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение, очистка и структурное исследование proSerPH122. Биосинтез рекомбинантного пробелка proSerPH122 проводили с использованием экспрессионной системы *K. kurtzmanii*, зарекомендовавшей себя в качестве эффективной альтернативы широко распространенной системе экспрессии на основе *K. phaffii*, ранее *P. pastoris* (“Invitrogen”, США) [13, 14].

С целью получения штамма-продуцента рекомбинантного пробелка proSerPH122 клетки реципиентного штамма дрожжей *K. kurtzmanii* Y727his4Δ трансформировали экспрессионной конструкцией pPH727-proSerPH122. Трансформанты выращивали в стеклянных колбах в условиях индукции метанолом при температуре 20 и 30°C в течение 4 и 3 сут соответственно. Полученные образцы КЖ анализировали с использованием электрофореза в ПААГ с Na-ДДС. Результат представлен на рис. 1. В образцах КЖ были обнаружены белковые продукты, представленные на электрофореграмме в виде отдельной полосы, расположенной в области 36 кДа, и в виде диффузного шмера, распределенного в области мол. масс от 40 до 80 кДа. Окраска этих продуктов была существенно более интенсивной в образце с индукцией при 30°C, в образце реципиентного штамма *K. kurtzmanii* Y727his4Δ (отрицательный контроль) такие продукты отсутствовали (рис. 1). Вероятно, несоответствие полученных молекулярных масс и расчетной (26.6 кДа) обусловлено гликозилированием.

Последовательность рекомбинантного белка proSerPH122 содержала два потенциальных сайта

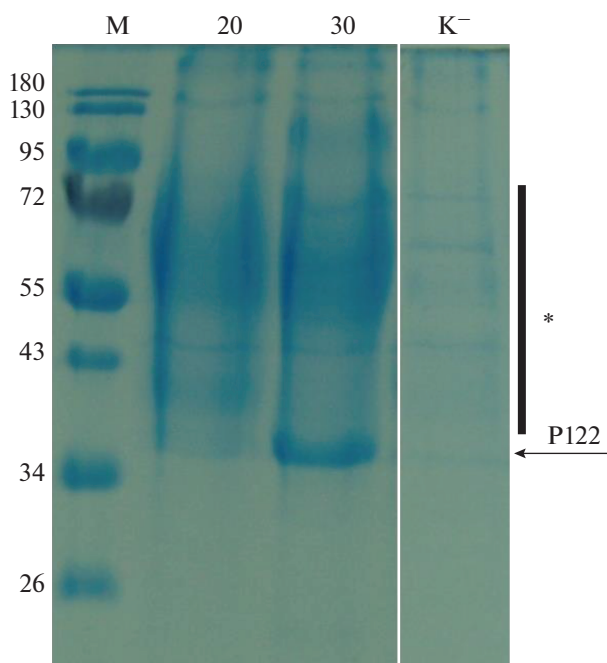


Рис. 1. Электрофорез белков КЖ трансформантов рРН727-proSerPH122. М – маркеры молекулярной массы; К⁻ – отрицательный контроль (Y727his4Δ); 20 и 30 – образцы целевого белка proSerPH122, полученные при культивировании трансформантов рРН727-proSerPH122 при температуре 20 и 30°C соответственно. Стрелкой показано расположение мажорной полосы целевого гликозилированного белка (P122). *Обозначена область распределения гипергликозилированных форм целевого белка.

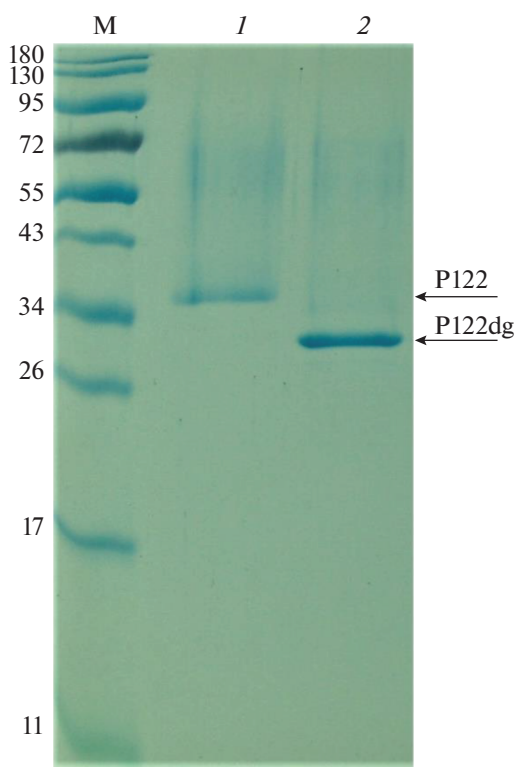


Рис. 2. Электрофоретический контроль дегликозилирования очищенного препарата proSerPH122 с использованием эндогликозидазы Endo Н. М – маркеры молекулярной массы; 1 – препарат белка proSerPH122 после очистки методом металл-хелатной аффинной хроматографии; 2 – препарат очищенного белка proSerPH122 после дегликозилирования. Стрелками показано расположение мажорных полос гликозилированного (P122) и дегликозилированного (P122dg) белков.

N-гликозилирования: N₄₈AT и N₁₁₈ET (нумерация остатков соответствует зрелому активированному ферменту). Обработка белка эндогликозидазой Endo Н и последующий анализ продуктов реакции методом электрофореза в ПААГ с Na-ДДС (рис. 2) и масс-спектрометрии (рис. 3 и табл. 1) показал, что секреция целевого белка действительно осуществлялась в форме N-гликозилированного продукта. В частности, согласно данным электрофореза, в результате обработки продукта секреции Endo Н молекулярная масса мажорной полосы белка снижалась с 36 до 28 кДа (рис. 2). При этом интенсивность мажорной полосы значительно увеличивалась, а в области гипергликозилирования окраска практически исчезала.

По данным масс-спектрометрии средняя молекулярная масса спектра белковых продуктов снижалась с примерно 31 до 27 кДа (рис. 3). Анализ производных целевого белка (табл. 1) позволил предположить, что мажорным дегликозилированным продуктом является белок, содержащий 2 остатка N-ацетилглюкозамина (ММ = 27003, табл. 1). Появление такого продукта ожидалось в качестве результата полного дегликозилирования белка по двум сайтам, содержащим углеводные

компоненты, связанные с остатками аспарагина N-гликозидной связью. Наиболее вероятно, что другими вариантами были производные мажорного дегликозилированного продукта, содержащие 1 или 2 остатка маннозы Man и Man₂ (табл. 1), являющиеся потенциальными продуктами O-гликозилирования белка, и продукт деградации белка, у которого отсутствовал концевой гистидин (desHis_{Cend}).

Энзиматические свойства SerPH122. Полная последовательность белка-гомолога SerPH122 (GenBank MW882981) содержит сигнальный пептид (рис. 4, выделен синей скобкой), который по современным представлениям отщепляется в процессе секреции, а пропептид (рис. 4, выделен зеленой скобкой), заканчивающийся остатком аргинина (рис. 4, отмечен красной стрелкой), обычно подвергается дальше процессингу с помощью трипсина [21, 22]. По сравнению с родоначальником семейства S1 химотрипсином быка (NCBI ID XP_003587247), имеющим каталитическую триаду His-Asp-Ser, гомолог SerPH122

содержит в активном центре аминокислотные остатки His-Asp-Thr (рис. 4, отмечены красным). Замена существенного для катализа аминокислотного остатка Ser на синонимичный остаток Thr у гомолога все же позволила предположить наличие у него протеолитической активности.

Для поиска возможных энзиматических свойств полученный в виде пробелка гомолог proSerPH122 процессировали предварительно трипсином. Оказалось, что протеолитическая активность зрелого процессированного гомолога SerPH122 проявлялась по хромогенному пептидному субстрату Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, который широко используется для тестирования активности химотрипсина. Обе процессированные формы (гликозилированная, SerPH122g и дегликозилированная, SerPH122dg) были протеолитически активны и гидролизовали субстрат Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (рис. 5). Интересно, что обе непроецессированные формы пробелка proSerPH122 (гликозилированная и дегликозилированная) также обладали протеолитической активностью, однако она была в 1.5 раза ниже, чем у процессированных зрелых форм (рис. 5). Полученный результат может свидетельствовать о том, что гликозилирование не влияет на проявление активности гомолога. По сравнению с пептидазой *T. molitor* из семейства S1 SerP38 (NCBI ID QRE01764) [13], удельная активность по тому же субстрату Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA у SerPH122 была в 600 раз ниже. Протеолитическая активность недавно была описана у гомолога сериновой пептидазы из яда эктопаразитоида *Scleroderma guani*. Активный центр белка содержал аминокислотные остатки Ser-Asp-Ser вместо типичной каталитической триады сериновых пептидаз His-Asp-Ser. Гомолог проявлял трипсиноподобную активность при гидролизе субстрата Vz-Arg-pNA (N α -бензоил-Arg-(п-нитроанилида)) [6].

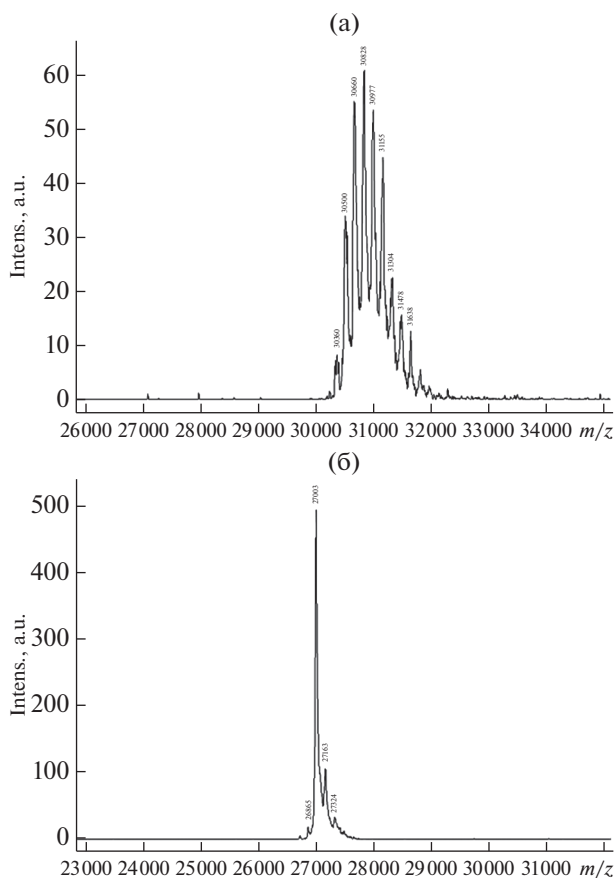


Рис. 3. Масс-спектры образцов очищенного белка proSerPH122 перед дегликозилированием (а) и после дегликозилирования с помощью эндогликозидазы Endo H (б).

Значение pH, оптимальное для работы гомолога SerPH122, определяли в соответствии с физиологическими уровнями кислотности в кишечнике личинок *T. molitor*: pH 5.6 в передней части и pH 7.9 в задней части средней кишки [23]. На рис. 6

Таблица 1. Расчетная и экспериментальная молекулярные массы (мол. массы) различных производных дегликозилированного белка proSerPH122dg

Экспериментальная мол. масса	Расчетная мол. масса различных модификаций				
	–	(NAG) ₂	(NAG) ₂ desHis _{Cend}	(NAG) ₂ Man	(NAG) ₂ Man ₂
26591		$+(221 - 18) \times 2$	$+(221 - 18) \times 2 - (155 - 18)$	$+(221 - 18) \times 2 + (180 - 18)$	$+(221 - 18) \times 2 + (180 - 18) \times 2$
26865			26860		
27003		26997			
27163				27159	
27324					27321

Примечание. NAG – присоединен N-ацетилглюкозамин, Man – дополнительное маннозилирование.

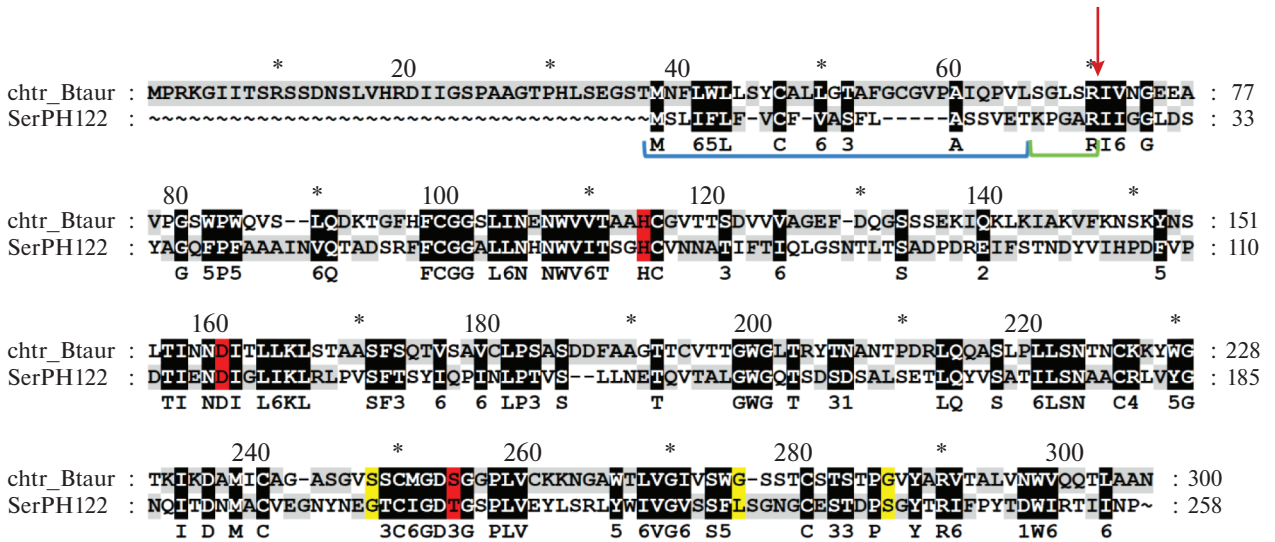


Рис. 4. Множественное выравнивание последовательностей SerPH122 *T. molitor* и родоначальника семейства S1 химотрипсина быка (chtr_Btaur, NCBI ID XP_003587247). Сигнальный пептид SerPH122 выделен синей скобкой, пропептид – зеленой скобкой, предположительный сайт процессинга трипсином отмечен красной стрелкой. Аминокислотные остатки активного центра выделены красным, субстрат связывающего субсайта S1 – желтым.

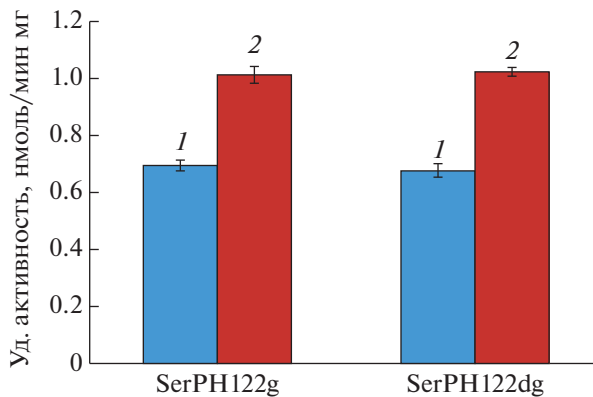


Рис. 5. Протеолитическая активность гомолога SerPH122 в гликозилированной (SerPH122g) и дегликозилированной (SerPH122dg) формах по хромогенному субстрату Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. 1 – исходный пробелок (proSerPH122), 2 – процессированный зрелый белок после обработки трипсином (SerPH122).

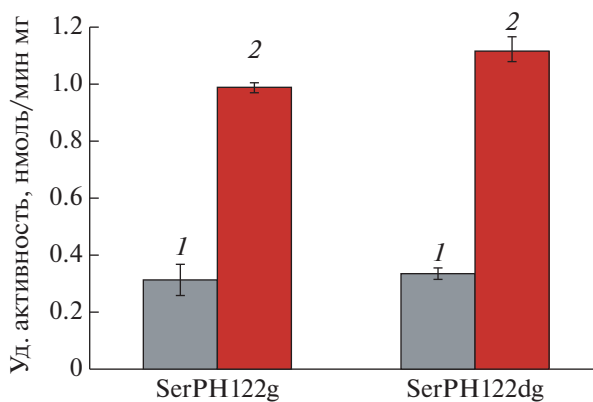


Рис. 6. Зависимость удельной активности (нмоль/мин мг) процессированного гомолога SerPH122 от значения pH: 1 – pH 5.6; 2 – pH 7.9.

показано, что активность SerPH122 выше при значении рН 7.9.

Таким образом, разработан метод получения рекомбинантного белка-гомолога сериновых пептидаз proSerPH122 *T. molitor*, подобраны условия его очистки с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии, проведены дегликозилирование эндогликозидазой Endo H и процессинг пробелка до зрелой формы. Показано, что: (1) полученный гомолог подвергался процессингу под действием трипсина, (2) проявлял невысокую, но достоверно детектируемую химотрипсин-подобную активность при использовании в качестве субстрата Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, причем при рН 7.9, в слабощелочных условиях, характерных для содержимого задней части средней кишки личинок *T. molitor*, активность SerPH122 значительно выше, чем при рН 5.6, в условиях содержимого передней части средней кишки, (3) гликозилирование не оказывало влияния на изученные свойства. Настоящая работа вносит вклад в исследование малоизученной области функционирования псевдопептидаз и может послужить основой для выяснения связи между структурой и функцией сериновых пептидаз и их гомологов.

Авторы выражают благодарность к. х. н. М.В. Серебряковой за проведение масс-спектрометрического анализа препарата рекомбинантного гомолога proSerPH122.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-00080).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rawlings N.D., Barrett A.J., Thomas P.D., Huang X., Bateman A., Finn R.D. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. № D1. P. D624–D632. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>
2. Brown J.R., Hartley B.S. // *Biochem. J.* 1966. V. 101. № 1. P. 214–228. <https://doi.org/10.1042/bj1010214>
3. Perona J.J., Hedstrom L., Rutter W.J., Fletterick R.J. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. № 5. P. 1489–1499. <https://doi.org/10.1021/bi00005a004>
4. Perona J.J., Craik C.S. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. № 3. P. 337–360. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040301>
5. Wex T., Lipyansky A., Brömme N.C., Wex H., Guan X.Q., Brömme D. // *Biochemistry.* 2001. V. 40. № 5. P. 1350–1357. <https://doi.org/10.1021/bi002266o>
6. Wu C.Y., Huang J.M., Zhao Y.J., Xu Z.W., Zhu J.Y. // *Toxicon.* 2020. V. 183. P. 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.05.011>
7. Pils B., Schultz J. // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 340. № 3. P. 399–404. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.04.063>
8. Yang L., Lin Z., Fang Q., Wang J., Yan Z., Zou Z., Song Q., Ye G. // *Dev. Comp. Immunol.* 2017. V. 77. P. 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.07.014>
9. Reynolds S.L., Fischer K. // *Biochem. J.* 2015. V. 468. № 1. P. 17–24. <https://doi.org/10.1042/BJ20141506>
10. Bryant B., Ungerer M.C., Liu Q., Waterhouse R.M., Clem R.J. // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2010. V. 40. № 7. P. 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.04.011>
11. Martynov A.G., Elpidina E.N., Perkin L., Oppert B. // *BMC Genomics.* 2015. V. 16. № 75. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1306-x>
12. Naumov G.I., Naumova E.S., Tyurin O.V., Kozlov D.G. // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2013. V. 104. № 3. P. 339–347. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9956-7>
13. Горбунов А.А., Акентьев Ф.И., Губайдуллин И.И., Жиганов Н.И., Терещенкова В.Ф., Эллидина Е.Н., Козлов Д.Г. // *Биотехнология.* 2020. Т. 36. № 6. С. 78–86. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-6-78-86>
14. Матвеева А.Ю., Губайдуллин И.И., Федоров А.С., Козлов Д.Г. // *Биотехнология.* 2019. Т. 35. № 5. С. 3–11. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-5-3-11>
15. Kozlov D.G., Yagudin T.A. // *Biotechnol. Lett.* 2008. V. 30. № 9. P. 1661–1663. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9739-9>
16. Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. // *Mol. Syst. Biol.* 2011. V. 7. P. 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
17. Nicholas K.B., Nicholas H.B. Jr., Deerfield D.W. II. // *Embnew. News.* 1997. V. 4. P. 14. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>
18. Almagro Armenteros J.J., Tsirigos K.D., Sonderby C.K., Petersen T.N., Winther O., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. // *Nat. Biotechnol.* 2019. V. 37. № 4. P. 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
19. Терещенкова В.Ф., Клячко Е.В., Беневоленский С.В., Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е., Филиппова И.Ю., Эллидина Е.Н. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2019. Т. 55. № 3. С. 231–236.
20. Frugoni J.A.C. // *Gazz. Chem. Ital.* 1957. V. 87. P. 403–407.
21. Parry M.A., Fernandez-Catalan C., Bergner A., Huber R., Hopfner K.P., Schlott B., Gührs K.H., Bode W. // *Nat. Struct. Biol.* 1998. V. 5. № 10. P. 917–923. <https://doi.org/10.1038/2359>
22. Hedstrom L. // *Chem. Rev.* 2002. V. 102. № 12. P. 4501–4524. <https://doi.org/10.1021/cr000033x>
23. Vinokurov K.S., Elpidina E.N., Oppert B., Prabhakar S., Zhuzhikov D.P., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A. // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2006. V. 145. № 2. P. 126–137. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.05.005>

Preparation and Properties of the Recombinant *Tenebrio molitor* SerPH122 – Proteolytically Active Homolog of Serine Peptidase

V. F. Tereshchenkova^a, N. I. Zhiganov^b, P. I. Akentyev^{c, d}, I. I. Gubaidullin^{c, d}, D. G. Kozlov^d,
N. V. Belyaeva^b, I. Yu. Filippova^a, and E. N. Elpidina^{e, *}

^aLomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, 119991 Russia

^bLomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, 119991 Russia

^cNational Research Center “Kurchatov Institute” – GOSNIIGENETIKA, Kurchatov Genomic Center, Moscow, 117545 Russia

^dNational Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

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

*e-mail: elp@belozersky.msu.ru

Pseudoenzymes – are homologs of active enzymes that have amino acid substitutions in the active center and, therefore, usually do not possess enzymatic activity. In this work, we obtained a recombinant proprotein (pro-SerPH122) of the homolog of serine peptidases of the S1 family from the yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) in the yeast producer strain *Komagataella kurtzmanii*. The target His₆-tagged protein was produced in a glycosylated form during secretion in yeast. The study of properties was carried out for both glycosylated and deglycosylated forms. To study the enzymatic properties, the proSerPH122 homolog with the replacement of active site Ser by Thr was pretreated with trypsin. The processed mature homolog SerPH122 was shown to have low, but reliably detectable activity with the chromogenic substrate Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, and this activity did not depend on the level of its glycosylation.

Keywords: pseudoenzymes, pseudopeptidases, homolog of serine peptidases of the S1 family, production of a recombinant protein, *Tenebrio molitor*