

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-48

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ АКТИВНОЙ ФОРМЫ ПРОТЕАЗЫ Ulp1 И ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ГИДРОЛИЗА SUMO-ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВ

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR OBTAINING THE ACTIVE FORM OF Ulp1 PROTEASE AND SELECTION OF OPTIMAL CONDITIONS FOR HYDROLYSIS OF SUMO-HYBRID PROTEINS

П. С. Астрелина, А. В. Казакова

R&D ГЕРОФАРМ, Санкт-Петербург

P. S. Astrelina, A. V. Kazakova

R&D GEROPHARM, Saint Petersburg

✉ Polina.Astrelina@geropharm.com

Аннотация

В работе представлен метод получения активной формы протеазы Ulp1 в виде свежеприготовленного солюбилизата телец включения. Проведен подбор условий гидролиза SUMO-гибридного белка, определена минимальная концентрация фермента, обеспечивающая полную конверсию гибридного белка.

Abstract

The paper presents a method for obtaining the active form of Ulp1 protease in the form of freshly prepared solubilized inclusion bodies. The conditions of hydrolysis of the SUMO hybrid protein were selected, the minimum concentration of the enzyme was determined, which ensures complete conversion of the hybrid protein.

Белки SUMO (*small ubiquitin-like modifier proteins*) представляют собой семейство небольших молекул, которые ковалентно присоединяются к другим белкам в клетке или отделяются от них для изменения функции модифицируемых субстратов. В биотехнологии SUMO могут использоваться в качестве метки для рекомбинантных белков. В настоящий момент технология получения SUMO-гибридных белков является распространенным инструментом для повышения функциональной экспрессии белка у про- и эукариот, а также для улучшения его растворимости. Как правило, в качестве N-концевой метки используется *Saccharomyces cerevisiae* Smt3 (дрожжевой SUMO). Метка эффективно удаляется SUMO протеазой 1 (Ulp1), распознающей трехмерную структуру SUMO, а также C-концевую последовательность. В результате расщепления образуется целевой белок с нативным N-концом. Распространенным решением является добавление полигистидиновой метки (His 6 tag) к протеазе для облегчения дальнейшей очистки образца от фермента.

Получение и очистка рекомбинантной протеазы Ulp1 в лабораторных условиях достаточно затруднены и требуют тщательного подхода к разработке. В качестве варианта производства применяется экспрессия каталитического домена Ulp1 в клетках *E. coli* в растворимой форме с дальнейшей экстракцией. Однако исследования показывают, что растворимый Ulp1 может быть токсичен для клеток-продуцентов [1], что снижает конечный выход фермента. Ulp1 также может быть получен в виде телец включения с сохранением высоких показателей выхода; но для его преобразования в активную форму необходимы дополнительные длительные стадии очистки, которые снижают его каталитическую активность. Использование готовой коммерческой формы фермента также сопряжено с рядом трудностей. Среди недостатков исследователи отмечают высокую стоимость, труднодоступность товара, сложности хранения и транспортировки [2].

В работе рассмотрен быстрый и эффективный метод получения активной формы Ulp1 из телец включения. Для удаления остатков питательной среды и клеточного дебриса была проведена отмывка материала в буфере состава 5 мМ EDTA, 20 мМ Tris, 2 М Urea, 0,5 % Sodium deoxycholate в соотношении 10 мл буфера на 1 г телец. Далее проводили солюбилизацию телец включения для перевода фермента в растворимую форму. Для оценки активности протеазы при проведении гидролиза свежеприготовленный солюбилизиат в разных концентрациях добавляли к субстрату гибридного SUMO-белка, смесь выдерживали в течение одного часа при комнатной температуре. Эффективность гидролиза оценивали методом SDS-PAGE.

В ходе экспериментов было обнаружено, что наиболее полная конверсия гибридного белка наблюдается при использовании 0,08–0,16 г телец включения протеазы на 1 г белка. При этом было показано, что добавление

DTT до конечной концентрации 0,5 мМ в растворе реакционной смеси значительно повышает ферментативную активность, в результате чего полный гидролиз белка наблюдается уже при соотношении 0,01 г телец на 1 г белка. Ulp1 входит в семейство цистеиновых протеаз, следовательно, ее каталитическая активность может быть увеличена путем добавления агентов, восстанавливающих S–S связи, например дитиотреитола.

Таким образом, в ходе работы была показана возможность использования свежеприготовленного солюбилизата Ulp1 для ферментативного гидролиза SUMO-гибридных белков. Решение имеет ряд преимуществ перед другими методами получения протеазы. Во-первых, рассмотренный метод позволяет быстро получить активный фермент с минимальным количеством затрачиваемых ресурсов. Во-вторых, в свежеприготовленных растворах соединение проявляет максимальную активность, что значительно снижает расход фермента. Кроме того, благодаря процедуре отмывки телец включения солюбилизат Ulp1 обладает достаточной степенью чистоты, в результате чего загрязнение целевого продукта минимально.

Полученные данные могут быть применены в области разработки технологических схем очистки рекомбинантных белков.

Литература

1. Linova M. Y. et al. A novel approach for production of an active N-terminally truncated Ulp1 (SUMO protease 1) catalytic domain from *Escherichia coli* inclusion bodies // Protein Expression Purification. 2020. Vol. 166. P. 105507.
2. Lau Y.-T. K. et al. Discovery and engineering of enhanced SUMO protease enzymes // J. Biol. Chem. 2018. Vol. 293, № 34. P. 13224–13233.