

ГЕНЕТИКА, ПРОТЕОМИКА И МЕТАБОЛОМИКА GENETICS, PROTEOMICS AND METABOLOMICS

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА МЕТИОНИН-АМИНОПЕПТИДАЗЫ БАКТЕРИИ *THERMUS THERMOPHILUS* И ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА

Быков В.В.,
Вологжанникова А.А.,
Трунилина М.В.,
Кудряшов Т.А.,
Соколов А.С.,
Лаптева Ю.С.

Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований РАН» (142290, г. Пушкино, просп. Науки, 3, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Лаптева Юлия Сергеевна,
e-mail: yulia.s.lapteva@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Метионин-аминопептидазы (МАП) – это класс ферментов, которые катализируют удаление N-концевого иницирующего метионина из полипептидной цепи. Бактериальные МАП рассматриваются в качестве мишеней для разработки антибактериальных препаратов широкого спектра действия, а применение МАП в биотехнологии обуславливает поиск новых МАП, исследование механизмов их функционирования и ингибирования. **Цель исследования.** Идентификация метионин-аминопептидазы в геноме *Thermus thermophilus* (Tt-МАП) и подтверждение её функциональной активности.

Материалы и методы. Для идентификации Tt-МАП был проведён анализ генома *Thermus thermophilus* в базе данных GeneBank. Для клонирования в векторе pHUE предполагаемой открытой рамки считывания (ОРС), кодирующей Tt-МАП, были использованы современные методы генной инженерии (полимеразная цепная реакция, рестрикция, трансформация, гетерологичная экспрессия). Для получения очищенного препарата фермента были использованы различные методы хроматографии (аффинная, ионообменная и эксклюзионная). Для подтверждения специфической функциональной аминокептидазной активности фермента использовали флюорогенный субстрат L-метионин 7-амино-4-метилкумарин (Met-АМС).

Результаты. В геноме бактерии *Thermus thermophilus* идентифицирована ОРС, кодирующая МАП. На основании нуклеотидной последовательности были составлены олигонуклеотидные праймеры. ОРС клонирована в векторе, и проведена наработка рекомбинантного фермента в клетках *E. coli*. С использованием ряда последовательных хроматографий разработана методика очистки фермента до гомогенного состояния, позволяющая получать до 30 мг с 1 л культуры. С использованием флюорогенного субстрата Met-АМС была показана специфическая функциональная активность фермента (фермент отщепляет метионин от субстрата).

Заключение. Нами проведена идентификация МАП *Thermus thermophilus* и проверка её функциональной активности. Показано, что продукт ОРС ТТНА1670 кодирует специфичную к метионину аминокептидазу, т. е. метионин-аминопептидазу. Фермент может быть использован в различных отраслях биотехнологии и научных исследованиях.

Ключевые слова: метионин-аминопептидаза, *Thermus thermophilus*, гетерологичная экспрессия, удаление N-концевого метионина

Статья поступила: 26.02.2024

Статья принята: 16.09.2024

Статья опубликована: 22.11.2024

Для цитирования: Быков В.В., Вологжанникова А.А., Трунилина М.В., Кудряшов Т.А., Соколов А.С., Лаптева Ю.С. Клонирование гена метионин-аминопептидазы бактерии *Thermus thermophilus* и подтверждение функциональной активности фермента. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(5): 75-83. doi: 10.29413/ABS.2024-9.5.8

CLONING OF THE *THERMUS THERMOPHILUS* METHIONINE AMINOPEPTIDASE GENE AND CONFIRMATION OF THE ENZYME FUNCTIONAL ACTIVITY

Bykov V.V.,
Vologzhannikova A.A.,
Trunilina M.V.,
Kudryashov T.A.,
Sokolov A.S.,
Lapteva Yu.S.

Institute for Biological Instrumentation
of the Russian Academy of Sciences,
Pushchino Scientific Center
for Biological Research
of the Russian Academy of Sciences
(Nauki Ave. 3, Pushchino 142290,
Russian Federation)

Corresponding author:
Yulia S. Lapteva,
e-mail: yulia.s.lapteva@gmail.com

ABSTRACT

Background. Methionine aminopeptidases (MAPs) are a class of enzymes that catalyze the removal of the N-terminal initiator methionine from a polypeptide chain. Bacterial MAPs are considered as targets for the development of broad-spectrum antibacterial drugs, and using MAPs in biotechnology necessitates the search for new MAPs and the study of their functioning and inhibition mechanisms.

The aim of the study. To identify methionine aminopeptidase in the *Thermus thermophilus* genome (Tt-MAP) and to confirm its functional activity.

Materials and methods. To identify Tt-MAP, we analyzed the *Thermus thermophilus* genome in the GeneBank database. Modern genetic engineering techniques (polymerase chain reaction, restriction, transformation, heterologous expression) were used to clone the putative open reading frame (ORF) encoding Tt-MAP in the pHUE vector. Various chromatography techniques (affinity, ion exchange, and size-exclusion) were used to obtain a purified enzyme preparation. The fluorogenic substrate L-methionine 7-amino-4-methylcoumarin (Met-AMC) was used to confirm the specific functional aminopeptidase activity of the enzyme.

Results. An ORF encoding MAP was identified in the *Thermus thermophilus* bacterium genome. Oligonucleotide primers were designed based on the nucleotide sequence. The ORF was cloned in the vector, and the recombinant enzyme was produced in *E. coli* cells. A method for purifying the enzyme to a homogeneous state was developed using a series of sequential chromatographies, allowing up to 30 mg to be obtained from 1 liter of culture. Using the fluorogenic substrate Met-AMC, the specific functional activity of the enzyme was demonstrated (the enzyme cleaves methionine from the substrate).

Conclusion. We have identified the *Thermus thermophilus* MAP and tested its functional activity. It has been shown that the ORF product TTHA1670 encodes a methionine-specific aminopeptidase, i. e. methionine aminopeptidase. The enzyme can be used in various fields of biotechnology and scientific research.

Key words: methionine aminopeptidase, *Thermus thermophilus*, heterologous expression, removal of N-terminal methionine

Received: 26.02.2024
Accepted: 16.09.2024
Published: 22.11.2024

For citation: Bykov V.V., Vologzhannikova A.A., Trunilina M.V., Kudryashov T.A., Sokolov A.S., Lapteva Yu.S. Cloning of the *Thermus thermophilus* methionine aminopeptidase gene and confirmation of the enzyme functional activity. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(5): 75-83. doi: 10.29413/ABS.2024-9.5.8

ВВЕДЕНИЕ

Метионин-аминопептидазы (МАП) – это класс ферментов, которые катализируют удаление N-концевого иницирующего метионина из полипептидной цепи (NME, N-terminal methionine excision). Данная посттрансляционная модификация обнаружена у всех организмов, от бактерий до высших эукариот, и затрагивает 50–70 % клеточных белков [1]. Показано, что удаление N-концевого метионина необходимо для правильной субклеточной локализации белков, осуществляет контроль продолжительности жизни белков и предшествует другим посттрансляционным модификациям, например, N-концевому ацетилированию [1], миристоилированию, метилированию белков и др. [2]. Удаление N-концевого метионина катализируется специфическими ферментами – метионин-аминопептидазами (МАП). МАП из разных организмов различаются по субстратной специфичности, а эффективность NME ограничивается радиусом боковой цепи ($< 1,29 \text{ \AA}$) предпоследнего остатка, т. е. второго остатка после метионина. Обычно это небольшой, незаряженный остаток, такой как Gly, Ala, Ser, Pro, Thr или Val [3, 4]. Специфичность МАП *E. coli* убывает в ряду Ala > Gly > Ser > Pro > Thr > Val, а МАП архея *P. furiosus* в ряду Ala > Gly > Pro > Ser [5].

МАП эволюционно близки к креатиназе, пролидазе и аминопептидазе Р и принадлежат к семейству M24 (клан MG) [6]. Экзопептидазы клана MG представляют собой металл-зависимые ферменты, для активности которых требуются два иона Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} или Fe^{2+} . Co^{2+} является одним из лучших активаторов ферментов данного класса. В МАП из *Escherichia coli* (Ec-МАП) два иона кобальта связаны лигандами пяти аминокислотных остатков – один ион кобальта координируется Asp108, His171 и Glu204, второй – Asp97, Asp108 и Glu235 [7]. Константы связывания ионов Co^{2+} составляют $0,3 \pm 0,2 \text{ мкМ}$ и $\sim 2,5 \text{ мМ}$ для каждого из центров соответственно [8, 9].

Семейство МАП делится на два типа – тип I и тип II. Тип II характеризуется вставкой из ~60 аминокислот в аминопептидазный домен. В бактериях функционирует только МАП I типа, а в археях только МАП II типа [10]. В клетках эукариот обнаружены МАП I и II типа [11, 12]. Эти ферменты жизненно необходимы для роста и развития как про-, так и эукариот, а делеции генов МАП летальны для организма. В клетках эукариот МАП выполняют регуляторную функцию в ангиогенезе и прогрессировании опухолей и рассматриваются в качестве мишеней для терапии различных видов опухолей и паразитарных инфекций [13–17]. Бактериальные МАП интересны в качестве мишеней для разработки антибактериальных препаратов селективного действия [18–22]. Кроме того, МАП применяют в технологии пищевой промышленности, научных исследованиях и биотехнологии получения рекомбинантных ферментов, белков, пептидов, гормонов (например, интерферона альфа, ряда трансфераз, гормона роста и др.) [5, 23, 24]. Всё это обуславливает актуальность изучения механизмов функционирования МАП и их ингибирования. В настоящее время хорошо изучены МАП патогенных бактерий, однако нет исследований, посвящён-

ных МАП из термофильных бактерий. Ферменты бактерий рода *Thermus*, такие как полимеразы, протеазы, фосфатазы и др., широко применяются в различных областях биотехнологии ввиду их высокой стабильности к широкому диапазону температур, pH и денатурирующих веществ.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Идентификация метионин-аминопептидазы в геноме *Thermus thermophilus* и подтверждение её функциональной активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы бактерий, плазмиды и условия культивирования

В качестве источника гена МАП использовали геномную ДНК бактерии *T. thermophilus* HB8 (Tt-МАП) Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ В-1605). Штаммы *E. coli* E. cloni (F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) endA1 recA1 Φ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 araD139 Δ (ara,leu)7697 galU galK rpsL nupG λ -tonA (StrR)) и BL21(DE3) (fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hdsS λ DE3 = λ sBamHI Δ EcoRI-B int::[lacI::PlacUV5::T7 ген1] i21 Δ nin5) использовали в качестве хозяев для генетических манипуляций с плазмидами и для сверхэкспрессии белка соответственно. Плазмиду pHUE, любезно предоставленную R.T. Baker и соавт. [25], использовали для клонирования и экспрессии в *E. coli* BL21(DE3) OPG метионин-аминопептидазы *T. thermophilus*.

T. thermophilus выращивали при 60 °C в течение 16 ч при интенсивной аэрации со скоростью 180 об./мин в шейкере-инкубаторе или на чашках со средой *Thermus ruber* (5,0 г пептона, 1,0 г дрожжевого экстракта, 1,0 г крахмала), агаризованной 1,2%-м бакто-агаром. Штаммы *E. coli* выращивали при 37 °C в среде LB с добавлением ампициллина (100 мг/л) для селекции. Геномную ДНК *T. thermophilus* HB8 (идентификатор генома NCBI: NC_006461.1) получали при помощи коммерческого набора для выделения геномной ДНК (Евроген).

Клонирование гена метионин-аминопептидазы

Ген метионин-аминопептидазы *TTNA1670* (идентификатор гена NCBI: 3168294) был амплифицирован из геномной ДНК *T. thermophilus* с помощью ПЦР с использованием праймеров 5-TTCCGCGGTGGTGCCATCAAGCTGAAAAGCCCCTGG-3 и 5-TTTGGATCCTTACTACTCGGCCCGCGCCAG-3. Ген был клонирован под контроль промотора фага T7 между сайтами рестрикции *SacII* и *BamHI* в вектор pHUE. При такой стратегии клонирования целевой белок Tt-МАП находится в единой полипептидной цепи с убиквитином (UB-МАП), который предотвращает агрегацию рекомбинантных белков и позволяет слитым с ним белкам находиться в растворимом состоянии. На N-конце убиквитин содержит 6 остатков гистидина, что позволяет использовать металл-хелатную хроматографию для очистки белка. Вектор pHUE был любезно предоставлен коллегами из Австралии [25]. Нуклеотидные последователь-

ности плазмид подтверждали рестрикционным анализом и автоматическим секвенированием ДНК вставок.

Экспрессия фермента Tt-МАП с убиквитином в клетках *E. coli*

Сконструированные плазмиды были трансформированы в экспрессионный штамм клеток *E. coli* BL21 (DE3). Клетки высевали на питательную среду LB с селективным антибиотиком ампициллином. Для наработки фермента в препаративных количествах клетки нарабатывали в объёме 1 л среды 2YT с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл. Когда культура достигала оптической плотности 0,6–0,8 ОЕ, проводили индукцию синтеза белка путём добавления индуктора изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в концентрации 0,5 мМ и далее растили при температуре 22 °С в течение 3 ч. Биомассу осаждали при помощи центрифугирования и хранили при –70 °С или же сразу использовали для выделения. Анализ индукции проводили при помощи электрофореза в 15%-м полиакриламидном геле (ПААГ) в трис-глицериновом буфере.

Методика выделения и очистки фермента Tt-МАП

Биомассу клеток ресуспендировали в 30 мл буфера для лизиса (буфер А: 50 мМ Na₂HPO₄, 1 М NaCl, 5 мМ имидазола, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ) – ингибитора сериновых протеаз, 1 мМ бета-меркаптоэтанол (β-МЕ), 0,1 мг/мл лизоцима, pH = 8,0) и дезинтегрировали при помощи ультразвукового гомогенизатора Sonicator Q125 (Qsonica 125, США) при 75 % мощности в режиме работа/отдых прибора 15 с/30 с в течение часа на ледяной водяной бане. Растворимую фракцию белков отделяли от клеточного дебриса при помощи центрифугирования при 25000 g в течение 40 мин при 4 °С. Для очистки белка использовали программируемую хроматографическую станцию AKTA Start (GE Healthcare, США). Супернатант наносили на колонку Bio-Scale Mini Profinity IMAC (Bio-Rad, США), заряженную никелем, объёмом 5 мл, уравновешенную буфером А, со скоростью 0,5 мл/мин. Затем колонку промывали десятью объёмами (50 мл) буфера А со скоростью 1 мл/мин. Белок элюировали буфером Б (50 мМ Na₂HPO₄, 300 мМ имидазола, pH = 7,5) при скорости 0,5 мл/мин и собирали фракции по 1 мл. По результатам электрофоретического анализа фракции, содержащие химерный белок убиквитин-МАП (UB-МАП), объединяли, трижды подвергали диализу против 100-кратного избытка буфера 20 мМ Трис (pH = 8,2). Одновременно для расщепления полипептидной цепи химерного белка UB-МАП на последовательность убиквитина (UB) и целевого белка (Tt-МАП) проводили обработку химерного белка убиквитин-специфичной протеазой Usp2 (50–100-кратный молярный избыток целевого белка над протеазой) в течение 16 ч при 37 °С. При диализе наблюдается образование осадка ряда клеточных белков, который удаляется при помощи последующего центрифугирования при 25000 g в течение 40 мин при 4 °С. Для очистки Tt-МАП от убиквитина использовали ионообменную хро-

матографию и программируемую хроматографическую станцию AKTA Start (GE Healthcare, США). Раствор белка наносили на анионообменную колонку (объёмом 6 мл) TOYOPEARL® SuperQ-650 (Tosoh Bioscience, Япония), уравновешенную буфером 20 мМ Трис pH = 8,2, со скоростью 0,5 мл/мин. При этом убиквитин не садится на колонку и выходит в проскоке. Для удаления примесных белков колонку промывали буфером 20 мМ Трис pH = 8,2 со скоростью 1 мл/мин. Целевой белок Tt-МАП элюировали линейным градиентом NaCl от 0 до 1,5 М в буферной системе 20 мМ Трис pH = 8,2. Объём градиента составил 30 мл, скорость потока – 1 мл/мин. Затем белок Tt-МАП дополнительно очищали при помощи гель-фильтрации с использованием колонки Hi Prep™ 26/60 Sephacryl® S-100 HR (Cytiva, США), уравновешенной буфером 20 мМ Трис pH = 8,2 (скорость потока 1 мл/мин). Очищенный белок подвергали диализу при температуре 4 °С против буфера 20 мМ Трис pH = 8,0, 50 % глицерина, 1 мМ β-МЕ и хранили при –20 °С.

Концентрацию белка измеряли и рассчитывали при помощи аналитического спектрофотометра Agilent Technologies Cary 100 с учётом молекулярной массы (27819 Да) и молярного коэффициента экстинкции (30940 М⁻¹см⁻¹), рассчитанных на основе аминокислотной последовательности согласно С.Н. Расе и соавт. [26].

Проверка функциональной активности метионин-аминопептидазы

Функциональную активность Tt-МАП измеряли с помощью специфического субстрата L-метионин-7-амино-4-метилкумарина (Met-АМС). После отщепления L-метионина 7-амино-4-метилкумарин флуоресцирует (длина волны возбуждения 380 нм, эмиссии – 460 нм). Анализ проводили в 100 мкл реакционной смеси, содержащей 25 мМ HEPES pH = 7,5, 150 мМ KCl, 100 мкМ СоCl₂, 1–4 мкМ Tt-МАП и различные концентрации субстрата Met-АМС (0–600 мкМ). Сухой Met-АМС растворяли в диметилсульфоксиде и хранили при температуре –20 °С. Tt-МАП добавляли к реакционной смеси без Met-АМС и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Реакцию запускали добавлением Met-АМС, отслеживание эмиссии флуоресценции высвободившихся свободных АМС осуществляли с использованием ридера для микропланшетов BioTek Synergy H1 и чёрных 384-луночных микропланшетов Greiner Bio-One #781906. Длина волны возбуждения флуоресценции – 380 нм, эмиссии – 460 нм. Измерения проводили при температуре 45 °С (максимально возможная температура эксплуатации прибора) в течение 1 ч с интервалом в 1 мин (60 измерений), с орбитальным встряхиванием перед каждым измерением. Эксперименты проводились однократно. Для расчёта кинетических параметров Tt-МАП мы использовали следующие концентрации субстрата Met-АМС: 25, 100, 200, 300, 400 и 500 мкМ. Кинетические параметры определялись из наклона кривых флуоресценции при различных концентрациях субстрата путём их обработки при помощи программного обеспечения Microcal OriginPro 9.1 (OriginLab Corp., США). Среднее значение константы Михаэлиса – Ментен и стандартное отклоне-

белка использовали ИПТГ. При подборе условий индукции мы определили, что оптимальная концентрация индуктора – 0,5 мМ ИПТГ, температура культивирования – 22 °С, время роста клеток после индукции – 3 ч (рис. 2б). Электрофорез клеток *E. coli* с плазмидой pHUE-MAP после 3 ч индукции представлен на дорожке 1 рисунка 2б. Как видно, в клетках нарабатывается химерный белок (UB-МАП) массой примерно ~40 кДа, что соответствует сумме расчётных масс Тt-МАП (27,8 кДа) и убиквитина (~10 кДа). Убиквитин содержит шесть остатков гистидина на N-конце, что позволило нам очистить химерный белок UB-МАП при помощи аффинной металл-хелатной хроматографии. Тотальный препарат элюции с колонки Bio-Scale Mini Profinity IMAC (Bio-Rad, США) представлен на дорожке 2 рисунка 2б. Как видно из рисунка, помимо целевого белка UB-МАП, препарат содержит примеси других клеточных белков *E. coli*. Для дальнейшей

очистки Тt-МАП от примесей и убиквитина проводили обработку UB-МАП убиквитин-специфичной протеазой (Usp2) и разделяли их при помощи анионообменной хроматографии. Хочется отметить, что при переводе препарата из буфера 50 мМ Na₂HPO₄, 300 мМ имидазола, рН = 7,5 в буфер 20 мМ Трис, рН = 8,2 ряд клеточных белков выпадают в осадок, что способствует дополнительной очистке целевого белка. Препарат UB-МАП после гидролиза Usp2 и до анионообменной хроматографии представлен на дорожке 3 рисунка 2б. Как видно, препарат представлен двумя белками массой ~10 кДа и ~28 кДа, что соответствует убиквитину и Тt-МАП соответственно. При дальнейшей очистке препарата на анионообменном сорбенте TOYOPEARL SuperQ-650, убиквитин не садится на колонку и выходит в проскоке при нанесении (рис. 2, дорожка 4), а элюция Тt-МАП достигается за счёт градиента NaCl (рис. 2, дорожка 5). Тt-МАП

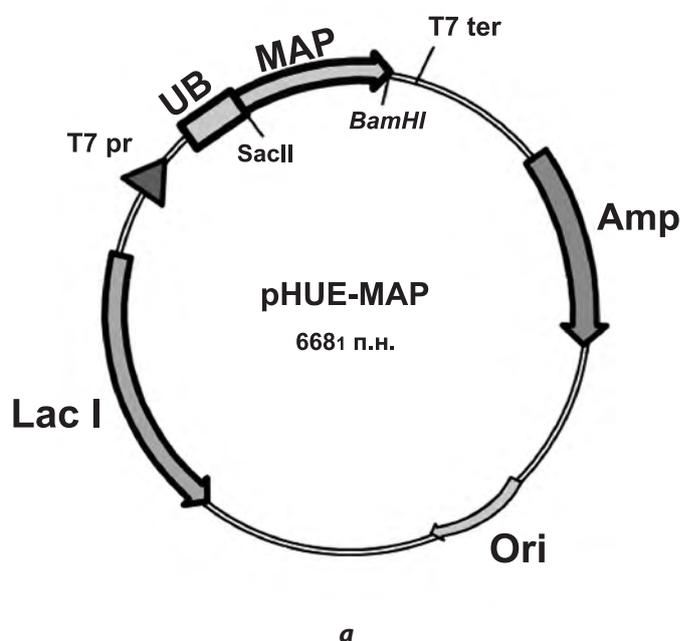


РИС. 2.
а – схема плазмидной конструкции pHUE-MAP, показывающая область убиквитина (UB; серый прямоугольник), область метионин-аминопептидазы (MAP; серая стрелка), промотор РНК-полимеразы Т7 (тёмно-серый треугольник) и другие области (серые стрелки), включая ColE1-ориджин репликации (Ori), ген репрессора LacI (LacI) и β-лактамазы (Amp). Стрелки указывают направление транскрипции. Показаны сайты рестрикции SacII/BamHI, использованные для клонирования гена Тt-МАП.
б – экспрессия в штамме *E. coli* BL21(DE3) и очистка Тt-МАП, отслеживаемая при помощи электрофореза в 15%-м ПААГ в денатурирующих условиях (окраска Кумасси бриллиантовым синим R-250): дорожка 1 – растворимый экстракт клеток после индукции; дорожка 2 – аффинно очищенный химерный белок UB-МАП до расщепления протеазой Usp2; дорожка 3 – аффинно очищенный химерный белок UB-МАП после расщепления протеазой Usp2; дорожка 4 – отделение молекулы убиквитина (дорожка 4) от Тt-МАП (дорожка 5); М – маркеры молекулярной массы (кДа)

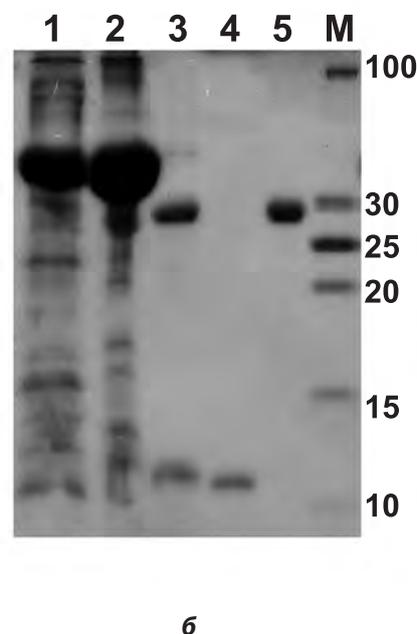


FIG. 2.
а – plasmid map of pHUE-MAP vector showing the ubiquitin (UB) coding region (gray box), methionine aminopeptidase (MAP) region (gray arrow), T7 RNA polymerase promoter (dark gray triangle), and other regions (gray arrows), including the ColE1 origin of replication (Ori), the LacI repressor gene (LacI), and β-lactamases (Amp). Arrows indicate the direction of transcription. The SacII/BamHI restriction sites used for cloning Tt-MAP gene are shown.
б – expression in *E. coli* strain BL21(DE3) and purification of Tt-MAP, monitored by reducing SDS-PAGE (15%; Coomassie brilliant blue R-250 staining): lane 1 – soluble cell extract after induction; lane 2 – affinity purified UB-MAP chimeric protein before cleavage by Usp2 protease; lane 3 – affinity purified UB-MAP chimeric protein after cleavage by Usp2 protease; separation of the ubiquitin molecule (lane 4) from Tt-MAP (lane 5) on TOYOPEARL SuperQ-650; M – molecular mass markers (kDa)

дополнительно очищали с использованием метода гель-фильтрации, переводили фермент в раствор с глицерином и хранили при -20°C . Таким образом, нами разработана методика получения в клетках *E. coli* рекомбинантного фермента МАП из *T. thermophilus*, позволяющая получать до 30 мг/л высокоочищенного препарата белка.

Проверка функциональной активности метионин-аминопептидазы

Для проверки функциональной активности различных МАП используют гидролизуемые хромогенные субстраты, такие как L-метионин паранитроанилид (Met-pNA) [29] или Met-АМС [30]. Для последнего константы Михаэлиса (K_m) таких ферментов, как МАП 2 и аминопептидаза N, составляют 310 и 377 мкМ соответственно ($\text{pH} = 7,5$, температура 30°C). Для проверки активности Tt-МАП мы использовали субстрат Met-АМС. Реакцию проводили в буферной системе HEPES $\text{pH} = 7,5$ (25 мМ) при максимально возможной для планшетного ридера температуре – 45°C . Поскольку МАП – это металл-зависимые протеазы, то для стимуляции активности Tt-МАП использовали ионы кобальта (0,1 мМ). С целью определения оптимального уровня сигнала флуоресценции использовалось разное соотношение фермент/субстрат. В качестве отрицательного контроля и для определения фоновой флуоресценции мы использовали реакцию, не содержащую Tt-МАП, но содержащую Met-АМС. 7-амино-4-метилкумарин, высвобождающийся при отщеплении метионина от Met-АМС, флуоресцирует при $\lambda_{\text{возб.}} = 380 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{исп.}} = 460 \text{ нм}$. График за-

висимости интенсивности флуоресценции от времени при различных соотношениях фермент/субстрат приведён на рисунке 3. Как видно из рисунка 3а, на протяжении 60 мин уровень фоновой флуоресценции в контроле не превышает 600 единиц флуоресценции, в то время как в опытных образцах происходит значительное усиление сигнала из-за появления в реакции свободного АМС. Это свидетельствует о том, что Tt-МАП проявляет специфическую функциональную активность в отношении метионина и следовательно является метионин аминопептидазой. Диапазон констант для МАП из различных видов бактерий варьирует от 250 до 980 мкМ [11]. Для расчёта K_m Tt-МАП мы использовали значения начальных скоростей реакций гидролиза ферментом следующих концентраций Met-АМС: 25, 100, 200, 300, 400 и 500 мкМ. Кинетические кривые обрабатывали при помощи программного обеспечения Microcal OriginPro 9.1 (OriginLab Corp., США). Среднее значение константы Михаэлиса – Ментен и стандартное отклонение получены из подгонки экспериментальных данных согласно уравнению Михаэлиса – Ментен. Рассчитанная нами K_m для Tt-МАП в отношении Met-АМС при температуре 45°C составляет $173 \pm 93 \text{ мкМ}$ (рис. 3б), что свидетельствует о высоком сродстве Tt-МАП к анализируемому субстрату. Очевидно, что температура 45°C не является оптимальной для работы фермента Tt-МАП из термофильной бактерии (фермент стабилен до 79°C) [31], однако это максимально возможная температура работы прибора для считывания кинетических параметров гидролиза Met-АМС. В дальнейшем мы планируем решить

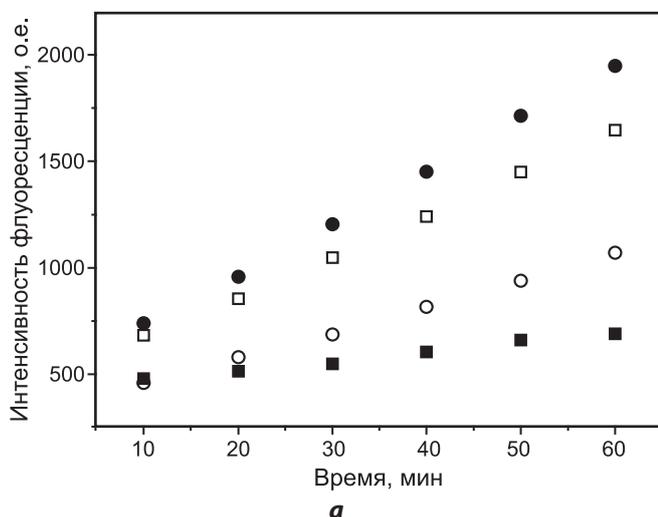


РИС. 3.

Проверка функциональной активности Tt-МАП: **а** – график зависимости интенсивности флуоресценции в реакции гидролиза Met-АМС при различных соотношениях фермент/субстрат (чёрный квадрат (■) – точки в контрольной реакции с Met-АМС без Tt-МАП; пустой кружок (○) – точки в реакции с 100 мкМ Met-АМС и 4 мкМ Tt-МАП; пустой квадрат (□) – точки в реакции с 200 мкМ Met-АМС и 4 мкМ Tt-МАП; чёрный кружок (●) – точки в реакции с 200 мкМ Met-АМС и 8 мкМ Tt-МАП); **б** – график Михаэлиса – Ментен гидролиза Met-АМС ферментом Tt-МАП в 25 мМ HEPES, 150 мМ KCl, 0,1 мМ CoCl_2 при 45°C

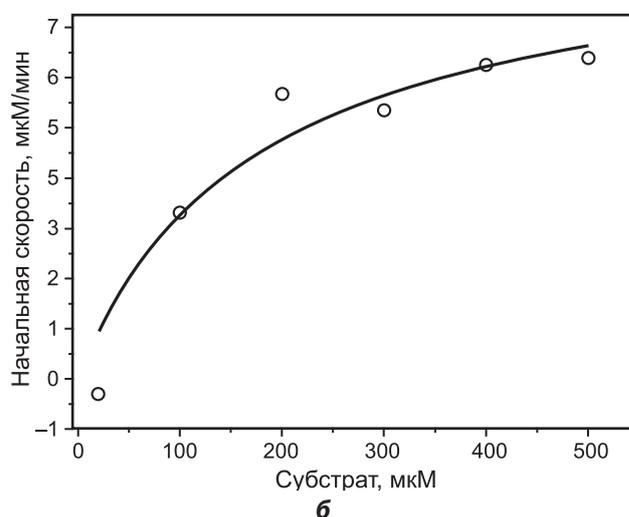


FIG. 3.

Testing the functional activity of Tt-MAP: **a** – graph of fluorescence intensity in the Met-AMC hydrolysis reaction at different enzyme/substrate ratios (black squares (■) indicate the points in the control reaction with Met-AMC without Tt-MAP; empty circles (○) indicate points in the reaction with 100 μM of Met-AMC and 4 μM of Tt-MAP; empty squares (□) indicate points in the reaction with 200 μM of Met-AMC and 4 μM of Tt-MAP; black circles (●) indicate the points in the reaction with 200 μM of Met-AMC and 8 μM of Tt-MAP); **b** – Michaelis – Menten plot for the hydrolysis of Met-AMC by Tt-MAP in 25 mM HEPES, 150 mM of KCl, 0.1 mM of CoCl_2 at 45°C

данную техническую проблему и исследовать температурный оптимум работы фермента и другие параметры.

Таким образом, проведённые в данной работе исследования, полученные результаты и разработанные методики создают хорошую базу для дальнейшего изучения фермента Tt-МАП из *T. thermophilus* и возможностей его применения в биотехнологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения данной работы нами проведена идентификация МАП *Thermus thermophilus* и проведена проверка её функциональной активности. Нами показано, что продукт ОРС *ТТНА1670* кодирует специфичную к метионину аминопептидазу, т. е. метионин-аминопептидазу. Разработанная нами оригинальная методика позволяет получать до 30 мг высокоочищенного фермента с 1 л культуры *E. coli*. Фермент может быть использован в различных отраслях биотехнологии и научных исследованиях для отщепления N-концевого метионина в белках и пептидах.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00563 (Соколов А.С.).

Конфликт интересов

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

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

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Gamerding M, Deuerling E. Cotranslational sorting and processing of newly synthesized proteins in eukaryotes. *Trends Biochem Sci.* 2024; 49(2): 105-118. doi: 10.1016/j.tibs.2023.10.003
- Chen L, Kashina A. Post-translational modifications of the protein termini. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 719590. doi: 10.3389/fcell.2021.719590
- Nguyen KT, Kim JM, Park SE, Hwang CS. N-terminal methionine excision of proteins creates tertiary destabilizing N-degrons of the Arg/N-end rule pathway. *J Biol Chem.* 2019; 294(12): 4464-4476. doi: 10.1074/jbc.RA118.006913
- Wingfield PT. N-terminal methionine processing. *Curr Protoc Protein Sci.* 2017; 88: 6.14.1-6.14.3. doi: 10.1002/cpps.29
- Arif A, Mohammed K, Nadeem MS. Biochemical and *in silico* evaluation of recombinant *E. coli* aminopeptidase and *in vitro* processed human interferon alpha-2b. *Turk J Biol.* 2018; 42(3): 240-249. doi: 10.3906/biy-1801-83
- Rawlings ND. Using the MEROPS database for investigation of lysosomal peptidases, their inhibitors, and substrates. *Methods Mol Biol.* 2017; 1594: 213-226. doi: 10.1007/978-1-4939-6934-0_14
- Roderick SL, Matthews BW. Structure of the cobalt-dependent methionine aminopeptidase from *Escherichia coli*: A new type of proteolytic enzyme. *Biochemistry.* 1993; 32(15): 3907-3912. doi: 10.1021/bi00066a009
- D'souza VM, Bennett B, Copik AJ, Holz RC. Divalent metal binding properties of the methionyl aminopeptidase from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 2000; 39(13): 3817-3826. doi: 10.1021/bi9925827
- Meng L, Ruebush S, D'souza VM, Copik AJ, Tsunasawa S, Holz RC. Overexpression and divalent metal binding properties of the methionyl aminopeptidase from *Pyrococcus furiosus*. *Biochemistry.* 2002; 41(23): 7199-7208. doi: 10.1021/bi020138p
- Bala S, Reddi B, Addlagatta A. A single amino acid difference between archaeal and human type 2 methionine aminopeptidases differentiates their affinity towards ovalicin. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2023; 1871(2): 140881. doi: 10.1016/j.bbapap.2022.140881
- Bala SC, Haque N, Pillalamarri V, Reddi R, Kashyap R, Marapaka AK, et al. Discovery of a new class of type 1 methionine aminopeptidases that have relaxed substrate specificity. *Int J Biol Macromol.* 2019; 129: 523-529. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.055
- Arya T, Reddi R, Kishor C, Ganji RJ, Bhukya S, Gumpena R, et al. Identification of the molecular basis of inhibitor selectivity between the human and streptococcal type I methionine aminopeptidases. *J Med Chem.* 2015; 58(5): 2350-2357. doi: 10.1021/jm501790e
- Goya Grocin A, Kallemeijn WW, Tate EW. Targeting methionine aminopeptidase 2 in cancer, obesity, and autoimmunity. *Trends Pharmacol Sci.* 2021; 42(10): 870-882. doi: 10.1016/j.tips.2021.07.004
- Friese-Hamim M, Ortiz Ruiz MJ, Bogatyrova O, Keil M, Rohdich F, Blume B, et al. Novel methionine aminopeptidase 2 inhibitor M8891 synergizes with VEGF receptor inhibitors to inhibit tumor growth of renal cell carcinoma models. *Mol Cancer Ther.* 2024; 23(2): 159-173. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-23-0102
- Watanabe N, Saito-Nakano Y, Kurisawa N, Otomo K, Suenaga K, Nakano K, et al. Fumagillin inhibits growth of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* by covalently binding to and selectively inhibiting methionine aminopeptidase 2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2023; 67(11): e0056023. doi: 10.1128/aac.00560-23
- Carducci MA, Wang D, Habermehl C, Bödding M, Rohdich F, Lignet F, et al. A first-in-human, dose-escalation study of the methionine aminopeptidase 2 inhibitor M8891 in patients with advanced solid tumors. *Cancer Res Commun.* 2023; 3(8): 1638-1647. doi: 10.1158/2767-9764.CRC-23-0048
- Steinberg E, Esa R, Schwob O, Stern T, Orehov N, Zamir G, Hubert A, et al. Methionine aminopeptidase 2 as a potential target in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Transl Res.* 2022; 14(9): 6243-6255.
- Helgren TR, Chen C, Wangtrakuldee P, Edwards TE, Staker BL, Abendroth J, et al. *Rickettsia prowazekii* methionine aminopeptidase as a promising target for the development of antibacterial agents. *Bioorg Med Chem.* 2017; 25(3): 813-824. doi: 10.1016/j.bmc.2016.11.013
- Zhang M, He S, Han X, Cui J, Wang H, Huo X, et al. Discovery of potential antituberculosis agents targeted methionine aminopeptidase 1 of *Mycobacterium tuberculosis* by the developed fluorescent probe. *Anal Chem.* 2023; 95(44): 16210-16215. doi: 10.1021/acs.analchem.3c02952
- Ye M, Xiong L, Dong Y, Xie C, Zhang Z, Shen L, et al. The potential role of the methionine aminopeptidase gene *PxMetAP1*

in a cosmopolitan pest for *Bacillus thuringiensis* toxin tolerance. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(21): 13005. doi: 10.3390/ijms232113005

21. Reddi B, Kishor C, Jangam A, Bala S, Rajeswari Batchu U, Gundla R, et al. Regioselectivity in inhibition of peptide deformylase from *Haemophilus influenzae* by 4- vs 5-azaindole hydroxamic acid derivatives: Biochemical, structural and antimicrobial studies. *Bioorg Chem.* 2022; 128: 106095. doi: 10.1016/j.bioorg.2022.106095

22. Bala S, Yellamanda KV, Kadari A, Ravinuthala VSU, Kattula B, Singh OV, et al. Selective inhibition of *Helicobacter pylori* methionine aminopeptidase by azaindole hydroxamic acid derivatives: Design, synthesis, *in vitro* biochemical and structural studies. *Bioorg Chem.* 2021; 115: 105185. doi: 10.1016/j.bioorg.2021.105185

23. Nandan A, Nampoothiri KM. Therapeutic and biotechnological applications of substrate specific microbial aminopeptidases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020; 104(12): 5243-5257. doi: 10.1007/s00253-020-10641-9

24. Pasquini M, Grosjean N, Hixson KK, Nicora CD, Yee EF, Lipton M, et al. Zng1 is a GTP-dependent zinc transferase needed for activation of methionine aminopeptidase. *Cell Rep.* 2022; 39(7): 110834. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110834

25. Baker RT, Catanzariti AM, Karunasekara Y, Soboleva TA, Sharwood R, Whitney S, et al. Using deubiquitylating enzymes as research tools. *Methods Enzymol.* 2005; 398: 540-554. doi: 10.1016/S0076-6879(05)98044-0

26. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 1995; 4(11): 2411-2423. doi: 10.1002/pro.5560041120

27. You C, Lu H, Sekowska A, Fang G, Wang Y, Gilles AM, et al. The two authentic methionine aminopeptidase genes are differentially expressed in *Bacillus subtilis*. *BMC Microbiol.* 2005; 5: 57. doi: 10.1186/1471-2180-5-57

28. Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci.* 2018; 27(1): 135-145. doi: 10.1002/pro.3290

29. Reddi R, Arya T, Kishor C, Gumpena R, Ganji RJ, Bhukya S, et al. Selective targeting of the conserved active site cysteine of *Mycobacterium tuberculosis* methionine aminopeptidase with electrophilic reagents. *FEBS J.* 2014; 281(18): 4240-4248. doi: 10.1111/febs.12847

30. Irfan I, Ali A, Reddi B, Khan MA, Hasan P, Ahmed S, et al. Design, synthesis and mechanistic studies of novel isatin-pyrazole hydrazone conjugates as selective and potent bacterial MetAP inhibitors. *Antibiotics (Basel).* 2022; 11(8): 1126. doi: 10.3390/antibiotics11081126

31. Lapteva YS, Bykov VV, Trunilina MV, Boldaevsky IS, Kudryashov TA, Vologzhannikova AA, et al. Obtaining overstable methionine aminopeptidase for the removal of methionine from recombinant proteins. *Journal Biomed.* 2023; 19(3E): 47-51. doi: 10.33647/2713-0428-19-3E-47-51

Сведения об авторах

Быков Вячеслав Владимирович – техник лаборатории новых методов в биологии, Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», e-mail: naggilan88@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0001-3978-7862>

Воложаникова Алиса Андреевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории новых методов в биологии, Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», e-mail: lisiks.av@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5550-2129>

Трунилина Мария Викторовна – инженер-биотехнолог лаборатории новых методов в биологии, Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», e-mail: masha.trunilina@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0002-9171-3083>

Кудряшов Тимофей Андреевич – младший научный сотрудник лаборатории новых методов в биологии, Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», e-mail: kudryashovtimm@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0001-2092-7028>

Соколов Андрей Сергеевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории новых методов в биологии, Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», e-mail: 212sok@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7145-251X>

Лapteва Юлия Сергеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории новых методов в биологии, Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», e-mail: yulia.s.lapteva@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6607-9861>

Information about the authors

Vyacheslav V. Bykov – Technician at the Laboratory of New Methods in biology, Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, e-mail: naggilan88@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0001-3978-7862>

Alisa A. Vologzhannikova – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Laboratory of New Methods in biology, Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, e-mail: lisiks.av@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5550-2129>

Maria V. Trunilina – Biotechnology Engineer at the Laboratory of New Methods in biology, Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, e-mail: masha.trunilina@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0002-9171-3083>

Timofey A. Kudryashov – Junior Research Officer at the Laboratory of New Methods in biology, Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, e-mail: kudryashovtimm@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0001-2092-7028>

Andrey S. Sokolov – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Laboratory of New Methods in biology, Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, e-mail: 212sok@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7145-251X>

Yulia S. Lapteva – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Laboratory of New Methods in biology, Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, e-mail: yulia.s.lapteva@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6607-9861>