

РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ИДЕНТИФИКАЦИИ N-КОНЦЕВЫХ АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗ БАКТЕРИЙ И ВЕРИФИКАЦИЯ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Т.А. Кудряшов*, М.В. Трунилина, В.В. Быков, И.С. Болдаевский,
А.С. Соколов, Ю.С. Лаптева

Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ
«Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3

N-концевые ацетилтрансферазы (NAT) бактерий ацетируют α -аминогруппу в аминокислотах и белках, участвуют в биосинтезе лантибиотиков и инактивации ряда антибиотиков. NAT находят применение в биотехнологии для направленного ацетилирования рекомбинантных белков и пептидов. В этой связи актуален поиск NAT, отличающихся по субстратной специфичности, а также способных функционировать в реакции при высоких температурах, широком диапазоне pH и др. Мы разработали специфические характеристики и алгоритм поиска для идентификации N-концевых ацетилтрансфераз на примере термофильной бактерии *Thermus thermophilus*. Из 14 аннотированных в геноме АТ мы отобрали шесть «предполагаемых» NAT. Часть генов, кодирующих отобранные NAT, были успешно клонированы, наработаны и очищены из клеток *E. coli*. Была подтверждена специфическая ферментативная активность ряда ферментов.

Ключевые слова: N-концевое ацетилирование, GNAT-фолд, антибиотики, метионин сульфоксимин, *Thermus thermophilus*

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00478.

Для цитирования: Кудряшов Т.А., Трунилина М.В., Быков В.В., Болдаевский И.С., Соколов А.С., Лаптева Ю.С. Разработка алгоритма идентификации N-концевых ацетилтрансфераз бактерий и верификация их функциональной активности. *Биомедицина*. 2023;19(3E):43–46. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-43-46>

Поступила 20.04.2023

Принята после доработки 16.05.2023

Опубликована 06.11.2023

DEVELOPMENT OF AN ALGORITHM FOR IDENTIFICATION OF N-TERMINAL ACETYLTRANSFERASES AND VERIFICATION OF THEIR FUNCTIONAL ACTIVITY

Timofey A. Kudryashov*, Maria V. Trunilina, Vyacheslav V. Bykov,
Igor S. Boldaevsky, Andrey S. Sokolov, Yulia S. Lapteva

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

N-terminal acetyltransferases (NATs) of bacteria acetylate the alpha-amino group in amino acids and proteins, participate in the biosynthesis of lantibiotics, and inactivate a number of antibiotics. NATs are used in biotechnology for targeted acetylation of recombinant proteins and peptides. In this regard, the search for NATs that differ in terms of substrate specificity and are also capable of functioning in the reaction at elevated temperatures, a wide pH range, etc., seems relevant. In this work, we develop specific characteristics and a search algorithm for the identification of N-terminal acetyltransferases using the *Thermus thermophilus* thermophilic bacterium as an example. Out of 14 Abs annotated in the genome, we selected six «putative» NATs. Some of the genes encoding the selected NATs were successfully cloned, generated, and purified from *E. coli* cells. The specific enzymatic activity of a number of enzymes was confirmed.

Keywords: N-terminal acetylation, GNAT-fold, microcin C, methionine sulfoximine, *Thermus thermophilus*

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the research was supported by a grant from the Russian Science Foundation, No. 23-24-00478.

For citation: Kudryashov T.A., Trunilina M.V., Bykov V.V., Boldaevsky I.S., Sokolov A.S., Lapteva Yu.S. Development of an Algorithm for Identification of N-terminal Acetyltransferases and Verification of Their Functional Activity. *Биомедицина*. 2023;19(3E):43–46. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-43-46>

Submitted 20.04.2023

Revised 16.05.2023

Published 06.11.2023

Ацетилирование играет важную регуляторную роль в поддержании метаболизма бактерий. N-ацетилтрансферазы (АТ) многочисленного (свыше 10 тыс. представителей) GNAT-суперсемейства бактерий ацетируют широкий круг субстратов: аминокислоты, витамины, антибиотики, полиамины, тРНК, белки, пептиды, структурные компоненты клеточных стенок и др. [1]. Среди АТ особый интерес представляют N-концевые АТ (NAT). NAT избирательно ацетируют α-аминогруппу в аминокислотах и белках, участвуют в синтезе/инактивации ряда антибиотиков [3, 7, 8]. NAT находят применение в биотехнологии для направленного ацетилирования рекомбинантных белков и пептидов [2, 4], а также рассматриваются в качестве мишеней для решения проблемы антибиотикорезистентности бактерий [5, 9]. АТ обладают низким процентом идентичности аминокислотных последовательностей, но высоким сродством третичных структур. В связи с этим классификация ферментов осуществляется в основном на основании предполагаемой укладки элементов вторичных структур (GNAT-фолд). Геномы бактерий содержат от 26 до 72 открытых рамок

считывания (ОПС) N-ацетилтрансфераз. Среди них на основании лишь аминокислотной последовательности сложно определить, является ли интересующий нас белок N-концевой АТ, полиамин-АТ или лизин-АТ. В этой связи актуальна разработка специфических характеристик и алгоритма поиска ферментов для каждой подгруппы АТ.

Целью данной **работы** является идентификация новых NAT и подтверждение их функциональной активности. В качестве модельного организма была выбрана гипертермофильная бактерия *Thermus thermophilus*. С использованием методов биоинформатики проведен анализ генома *T. thermophilus* HB8 и отобраны 14 аннотированных ацетилтрансфераз. Проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей отобранных АТ с известными белками-ортологами из бактерий *E. coli* и *Salmonella* spp. При помощи сервера BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) аминокислотные последовательности АТ исследованы на наличие в них консервативного аминокислотного мотива «(Q/R)-X-X-G-X-(G/A)», ответственного за связывание ацетил-кофермен-

та А. При помощи программы PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) и JPRED4 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>) проведено предсказание элементов вторичных структур на основе последовательности аминокислот каждой из АТ. Проведен анализ предсказанных структур NAT на их соответствие специфическому чередованию элементов вторичных структур «GNAT-fold».

В результате биоинформатического анализа нами были отобраны шесть предполагаемых NAT. Мы установили, что предполагаемые NAT имеют длину от 150 до 200 аминокислот, содержат вырожденный консенсус «(Q/R)-X-X-G-X-(G/A)» и консервативный «GNAT-fold». С целью подтверждения функциональной активности предполагаемых NAT гены, кодирующие эти ферменты (ТТНА_0176, ТТНА_0282, ТТНА_0790, ТТНА_1209 и ТТНА_1799), были клонированы в экспрессионные вектора. В настоящее время проведена работа и очистка двух рекомбинантных NAT (ТТНА_1799 и ТТНА_1209) в клетках *E. coli*. Для подтверждения N-концевой ацетилтрансферазной активности проводили реакцию ацетилирования *in vitro*, где в качестве донора ацетильной группы выступал ацетил-кофермент А, в качестве акцептора — рекомбинантный парвальбумин крысы. Методом масс-спектрометрии

установлено, что ферменты ТТНА_1209 и ТТНА_1799 ацетируют парвальбумин с эффективностью 20 и 80% соответственно. Ацетилирование N-концевой альфа-аминогруппы (а не ϵ -аминогрупп лизина) подтверждали при помощи реакции с флюоресцентным реактивом NBD-Cl, который избирательно реагирует со свободной α -аминогруппой. Биоинформатический анализ фермента ТТНА_1209 позволил отнести его к группе ферментов, ацетилирующих α -аминогруппы метионина и его производных метионин сульфоксидина (MSX) и метионин сульфата (MSO) [6]. Активность ТТНА_1209 в отношении MSX подтверждали в реакции с DTNB, который взаимодействует со свободными сульфгидрильными группами кофермента А, образующимися после ферментативного отщепления ацетильной группы ацетилтрансферазой и переноса ее на MSX.

Таким образом, нами сформулированы параметры, характерные для N-концевых АТ. Разработан алгоритм поиска, позволяющий идентифицировать N-концевые АТ. Подтверждена специфическая функциональная активность идентифицированных N-концевых АТ. Результаты исследования важны для систематики и классификации ферментов суперсемейства GNAT-ацетилтрансфераз, а также для понимания молекулярных основ их субстратной специфичности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Burckhardt R.M., Escalante-Semerena J.C. Small-Molecule Acetylation by GCN5-Related N-Acetyltransferases in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2020;15;84(2):e00090-19. DOI: 10.1128/MMBR.00090-19.
2. Chen J., et al. Production of N(alpha)-acetyl Talpa1-HSA through *in vitro* acetylation by RimJ. *Oncotarget.* 2017;8(56):95247–95255.
3. Deng S., Marmorstein R. Protein N-Terminal Acetylation: Structural Basis, Mechanism, Versatility, and Regulation. *Trends Biochem. Sci.* 2021;46(1):15–27.
4. Esipov R.S., et al. Development of the intein-mediated method for production of recombinant thymosin beta4 from the acetylated *in vivo* fusion protein. *J. Biotechnol.* 2016;228:73–81.
5. Hentchel K.L., Escalante-Semerena J.C. Acylation of Biomolecules in Prokaryotes: a Widespread Strategy for the Control of Biological Function and Metabolic Stress. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2015;79(3):321–346.
6. Hentchel K.L., Escalante-Semerena J.C. In *Salmonella enterica*, the Gcn5-related acetyltransferase MddA (formerly YncA) acetylates methionine sulfoximine

- and methionine sulfone, blocking their toxic effects. *J. Bacteriol.* 2015;197(2):314–325.
7. Huang E., Yousef A.E. Biosynthesis of paenibacillin, a lantibiotic with N-terminal acetylation, by *Paenibacillus polymyxa*. *Microbiol. Res.* 2015;181:15–21.
8. Kazakov T., et al. The RimL transacetylase provides resistance to translation inhibitor microcin C. *J. Bacteriology.* 2014;196(19):3377–3385.
9. Ren J., et al. Protein Acetylation and Its Role in Bacterial Virulence. *Trends Microbiol.* 2017;25(9):768–779.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Кудряшов Тимофей Андреевич*, Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований» РАН;

e-mail: kudryashovtim@gmail.com

Timofey A. Kudryashov*, Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: kudryashovtim@gmail.com

Трунилина Мария Викторовна, Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований» РАН;

e-mail: masha.trunilina@mail.ru

Maria V. Trunilina, Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: masha.trunilina@mail.ru

Быков Вячеслав Владимирович, Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований» РАН;

e-mail: naggilan88@gmail.com

Vyacheslav V. Bykov, Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: naggilan88@gmail.com

Болдаевский Игорь Сергеевич, Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований» РАН;

e-mail: i13boldaevsky@gmail.com

Igor S. Boldaevsky, Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: i13boldaevsky@gmail.com

Соколов Андрей Сергеевич, к.б.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований» РАН;

e-mail: 212sok@gmail.com

Andrey S. Sokolov, Cand. Sci. (Biol.), Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: 212sok@gmail.com

Лаптева Юлия Сергеевна, к.б.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований» РАН;

e-mail: yulia.s.lapteva@gmail.com

Yulia S. Lapteva, Cand. Sci. (Biol.), Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: yulia.s.lapteva@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author