

ПОЛУЧЕНИЕ СВЕРХСТАБИЛЬНОЙ МЕТИОНИНАМИНОПЕПТИДАЗЫ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ МЕТИОНИНА ИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

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

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

Отщепление N-концевого иницирующего метионина (Met1) является критически значимой ко- и посттрансляционной модификацией, затрагивающей 50–70% клеточных белков. При наработке рекомбинантных белков в гетерологичной системе экспрессии *E. coli* отщепление Met1 часто не происходит, что приводит к гетерогенности получаемых препаратов, изменению их активности и стабильности. Решают эту проблему обработкой рекомбинантных белков *in vitro* специфическим ферментом — метионинаминопептидазой (МАП). Имеющиеся в настоящее время МАП обладают ограниченными специфичностями и условиями проведения реакций. Нами клонирована МАП из гипертермофильной бактерии, разработана методика очистки фермента, исследован ряд физико-химических свойств. Новый фермент МАП обладает устойчивостью к высоким температурам. МАП сохраняет стабильное нативное состояние в диапазоне pH от 3 до 11 единиц. Новый фермент МАП может быть использован для удаления N-концевого Met1 из рекомбинантных белков *in vitro* в широком диапазоне pH и в условиях повышенных температур.

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

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00563.

Для цитирования: Лаптева Ю.С., Быков В.В., Трунилина М.В., Болдаевский И.С., Кудряшов Т.А., Вологжанникова А.А., Соколов А.С. Получение сверхстабильной метионинаминопептидазы для удаления метионина из рекомбинантных белков. *Биомедицина*. 2023;19(3E):47–51. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-47-51>

Поступила 20.04.2023

Принята после доработки 16.05.2023

Опубликована 06.11.2023

OBTAINING OVERSTABLE METHIONINE AMINOPEPTIDASE FOR THE REMOVAL OF METHIONINE FROM RECOMBINANT PROTEINS

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

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

Cleavage of the N-terminal initiating methionine (Met1) is a critical co- and post-translational modification affecting 50–70% of cellular proteins. During the production of recombinant proteins in the heterologous system of *E. coli* expression, Met1 cleavage often fails to occur, which leads to heterogeneity of the preparations obtained, changes in their activity and stability. This problem can be solved by treating recombinant proteins *in vitro* with a specific enzyme, methionine aminopeptidase (MAP). Currently available MAPs exhibit limited specificities and reaction conditions. We cloned a MAP from a hyperthermophilic bacterium, developed a method for enzyme purification, and studied a number of physicochemical properties. The new MAP enzyme is resistant to elevated temperatures. The MAP maintains a stable native state in a pH range from 3 to 11 units. The novel MAP enzyme can be used to remove N-terminal Met1 from recombinant proteins *in vitro* over a wide pH range and at elevated temperatures.

Keywords: methionine aminopeptidase, *Thermus thermophilus*, heterologous expression, N-terminal methionine excision

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

Funding: the research was supported by a grant from the Russian Science Foundation, No. 23-24-00563.

For citation: Lapteva Yu.S., Bykov V.V., Trunilina M.V., Boldaevsky I.S., Kudryashov T.A., Vologzhanikova A.A., Sokolov A.S. Obtaining Overstable Methionine Aminopeptidase for the Removal of Methionine From Recombinant Proteins. *Биомедицина*. 2023;19(3E):47–51. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-47-51>

Submitted 20.04.2023

Revised 16.05.2023

Published 06.11.2023

Введение

Биосинтез полипептидной цепи в клетках начинается с иницирующего метионина (Met1), который затем удаляется специфическим ферментом клеток — метионинаминопептидазой (МАП). Удаление Met1 является крайне консервативной и критически значимой ко- и посттрансляционной модификацией, затрагивающей 50–70% клеточных белков [6]. Модификация необходима для правильной субклеточной локализации белков [9], осуществляет контроль продолжительности жизни белков [7], предшествует другим посттрансляционным модификациям [3, 4]. При сверхэкспрессии рекомбинантных белков в *E. coli* отщепление Met1 либо совсем не происходит, либо происходит частично. В результате получаются препараты смеси белков с Met1 и без него. При сравнении двух форм рекомбинантного рибосомального белка S6 *T. thermophilus* (с N-концевым Met1 и без него) были показаны существенные различия в структурных свойствах белка и его конформационной стабильности [11]. Две формы

человеческого сывороточного амилоида А отличаются по способу фибриллообразования и патогенеза [10]. Отщепление Met1 критично для ферментативной активности и цитотоксичности онкоказы [8], а также необходимо для ряда биотехнологически значимых белков — гемоглобина человека [1], интерлейкина-2 [5], интерлейкина-36 альфа, гормона роста, рибонуклеаз лягушки и человека [2]. Поскольку удаление Met1 из рекомбинантного белка часто имеет решающее значение в поддержании его стабильности и функции, проводят либо коэкспрессию целевых белков с МАП из разных организмов, либо обработку рекомбинантных белков МАП *in vitro*. Имеющиеся в настоящее время коммерчески доступные МАП *E. coli* и человека обладают ограниченной субстратной специфичностью и условиями проведения реакций (температура и pH оптимум) *in vitro*. В этой связи актуален поиск новых МАП, особенно способных работать в условиях повышенных температур и широкого диапазона pH.

Целью данной **работы** является изучение тепловой и pH стабильности метионинаминопептидазы из гипертермофильной бактерии *Thermus thermophilus*.

Материалы и методы

Ген (GenBank: TTH_RS08450) метионинаминопептидазы *Thermus thermophilus* HB8 (BKM B-1605) клонирован в вектор под контроль гибридного T7lac промотора. Рекомбинантный фермент МАП нарабатывали в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3). Очистку фермента проводили при помощи металл-хелатной, ионнообменной и эксклюзионной хроматографии. Гомогенность препарата оценивали при помощи электрофореза в 15% ПААГ и методом масс-спектрометрии. С использованием метода собственной флуоресценции белка исследовали тепловую стабильность и pH-стабильность фермента. Поскольку МАП является кобальт-зависимой протеазой, проводилось исследование двух форм белков: апоформы (без металла) и кобальт-связанной формы (0,1 mM Co²⁺).

Результаты и их обсуждение

Ген МАП успешно амплифицирован нами из геномной ДНК *Thermus thermophilus* HB8 и клонирован в вектор pHUE. При индукции экспрессии МАП в клетках *E. coli* наблюдается наработка белка, соответствующего расчетной молекулярной массе фермента. Нами разработана методика очистки фермента, позволяющая получать его в гомогенном состоянии. При этом вы-

ход фермента составляет примерно 20 мг/Л культуры. Фермент МАП содержит четыре остатка триптофана и шесть остатков тирозина, что позволяет использовать метод собственной флуоресценции белка для изучения конформационных переходов в белке. С использованием этого метода провели исследование изменения конформации фермента при его нагревании от 20 до 98°C в буфере 50 mM Hepes pH=7,5, 150 mM KCl, 14 мкМ DTT. Нами показано, что середина теплового перехода белка из нативного в денатурированное состояние составляет 65°C для апоформы и 79°C — для кобальт-связанной формы. Это свидетельствует о том, что термостабильность фермента в апоформе составляет 65°C, а связывание ферментом ионов кобальта приводит к увеличению его термостабильности до 79°C. Методом собственной флуоресценции нами также исследована стабильность фермента в диапазоне pH 2–12. Нами установлено, что фермент сохраняет свою конформационную стабильность при pH от 3 до 11 единиц как в апоформе, так и в кобальт-связанном состоянии.

Выводы

Проведенные нами исследования свидетельствуют о том, что новый фермент МАП из гипертермофильной бактерии *Thermus thermophilus* может применяться в биотехнологии для удаления N-концевого иницирующего метионина из рекомбинантных белков *in vitro* в условиях высоких температур и в широком диапазоне pH среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Adachi K., et al. Expression of functional soluble human alpha-globin chains of hemoglobin in bacteria. *Protein Expr. Purif.* 2000;20(1):37–44.
2. Boix E., et al. Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity. *J. Mol. Biol.* 1996;257(5):992–1007.
3. Bradshaw R.A., Brickey W.W., Walker K.W. N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N alpha-acetyl transferase families. *Trends Biochem. Sci.* 1998;23(7):263–267.
4. Chen L., Kashina A. Post-translational Modifications of the Protein Termini. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;9:719590.
5. Endo S., et al. The additional methionine residue at the N-terminus of bacterially expressed human inter-

- leukin-2 affects the interaction between the N- and C-termini. *Biochemistry*. 2001;40(4):914–919.
6. Giglione C., Boularot A., Meinnel T. Protein N-terminal methionine excision. *Cell Mol. Life Sci*. 2004;61(12):1455–1474.
 7. Giglione C., Vallon O., Meinnel T. Control of protein life-span by N-terminal methionine excision. *EMBO J*. 2003;22(1):13–23.
 8. Liao Y.D., et al. The structural integrity exerted by N-terminal pyroglutamate is crucial for the cytotoxicity of frog ribonuclease from *Rana pipiens*. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(18):5247–5255.
 9. Meinnel T., Mechulam Y., Blanquet S. Methionine as translation start signal: a review of the enzymes of the pathway in *Escherichia coli*. *Biochimie*. 1993;75(12):1061–1075.
 10. Patke S., et al. Characterization of the oligomerization and aggregation of human Serum Amyloid A. *PLoS One*. 2013;8(6):e64974.
 11. Uversky V.N., et al. Structure and stability of recombinant protein depend on the extra N-terminal methionine residue: S6 permutein from direct and fusion expression systems. *Biochem. Biophys. Acta*. 1999;1432(2):324–332.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Лаптева Юлия Сергеевна, к.б.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский 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

Быков Вячеслав Владимирович, Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский 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

Трунилина Мария Викторовна, Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский 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

Болдаевский Игорь Сергеевич, Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский 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

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

e-mail: kudryashovtimm@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: kudryashovtimm@gmail.com

Вологжанникова Алиса Андреевна, к.б.н.,
Институт биологического приборостроения
ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр био-
логических исследований» РАН;
e-mail: lisiks.av@gmail.com

Alisa A. Vologzhannikova, Cand. Sci. (Biol.),
Institute for Biological Instrumentation, Pushchino
Scientific Center for Biological Research of the
Russian Academy of Sciences;
e-mail: lisiks.av@gmail.com

Соколов Андрей Сергеевич, к.б.н., Институт
биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ
«Пушинский научный центр биологических ис-
следований» 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

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author