

ФИЗИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА N-АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ RimL ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *THERMUS THERMOPHILUS*

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

Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, пр-кт Науки, 3

N-концевые ацетилтрансферазы (NAT) бактерий участвуют в биосинтезе/деградации антибиотиков. Фермент RimL из *E. coli* обеспечивает ей резистентность к антибиотику микроцину С. На сегодняшний день хорошо изучены NAT патогенных бактерий, однако отсутствуют данные о NAT термофильных бактерий. Целью работы является исследование физико-химических свойств и специфичности новой NAT — RimL из *Thermus thermophilus*. Нами клонирована ОРС RimL (*TTHA1799*) и разработана методика очистки фермента. Методом собственной флуоресценции белка исследована стабильность RimL к рН, высоким температурам и денатурирующим агентам. Нами получен термофильный фермент, который может применяться в биотехнологии для ацетилирования белков и пептидов в нестандартных условиях.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, микроцин С, N-ацетилтрансферазы, GNAT-токсин-антитоксин, *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: Трунилина М.В., Вологжанникова А.А., Кудряшов Т.А., Локтюшов Е.В., Быков В.В., Соколов А.С., Лаптева Ю.С. Физико-биохимические свойства N-ацетилтрансферазы RimL гипертермофильной бактерии *Thermus thermophilus*. *Биомедицина*. 2024;20(3):47–51. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-47-51>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 18.06.2024

Опубликована 10.09.2024

PHYSICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF N-ACETYL TRANSFERASE RimL OF THE HYPERTHERMOPHILIC BACTERIA *THERMUS THERMOPHILUS*

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

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

Bacterial N-terminal acetyltransferases (NATs) are involved in the biosynthesis/degradation of antibiotics. The RimL enzyme from *E. coli* provides it with resistance to the antibiotic microcin C. To date, the NATs of pathogenic bacteria have been well studied, but there is no data on the NATs of thermophilic bacteria. The purpose of the work is to study the physicochemical properties and specificity of a new NAT — RimL from *Thermus thermophilus*. We cloned the RimL ORF (*TTHA1799*) and developed a method for purifying the enzyme. The stability of RimL to pH, high temperatures and denaturing agents was studied using the protein intrinsic fluorescence method. We have obtained a thermophilic enzyme that can be used in biotechnology for the acetylation of proteins and peptides under non-standard conditions.

Keywords: antibiotic resistance, microcin C, N-acetyltransferase, GNAT-toxin-antitoxin, microcin C, *Thermus thermophilus*

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

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

For citation: Trunilina M.V., Vologzhannikova A.A., Kudryashov T.A., Loktyushov E.V., Bykov V.V., Sokolov A.S., Lapteva Yu.S. Physical and Biochemical Properties of N-Acetyl Transferase RimL of the Hyperthermophilic Bacteria *Thermus thermophilus*. *Journal Biomed.* 2024;20(3):47–51. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-47-51>

Submitted 15.04.2024

Revised 18.06.2024

Published 10.09.2024

Введение

N-ацетилтрансферазы (NAT) являются представителями многочисленного GNAT-суперсемейства ацетилтрансфераз (GNAT-AT) [1]. Ряд NAT участвуют как в биосинтезе, так и в инактивации антибиотиков [4, 6], формируют систему «токсин — антитоксин» типа II и рассматриваются в качестве мишеней для решения проблемы множественной антибиотикорезистентности бактерий [3, 7]. Резистентность к антибиотикам проявляет фермент RimL, который придаёт бактерии *E. coli* устойчивость к микроцину C и альбомуцину [6]. Ортологи RimL из разных бактерий ацетируют рибосомальный белок L12, который содержит N-концевой Ser или Ala [8]. NAT находят применение в практике направленного ацетилирования белков и пептидов [2, 5]. На сегодняшний день накоплены данные о ферментах патогенных бактерий, однако неизученными остаются ферменты термофильных бактерий, которые могут обладать преимуществами использования в биотехнологии перед своими мезофильными аналогами.

Цель работы — исследование физико-химических свойств и субстратной специфичности RimL из *T. thermophilus* (TTh-RimL).

Материалы и методы

Ген *TTHA1799*, кодирующий RimL (UniProt ID: Q5SHD1) бактерии *Thermus thermophilus*, клонировали в вектор pET-29 под контроль гибридного промотора T7/lac. Рекombинантный фермент RimL (TTh-RimL) нарабатывали в клетках *E. coli* BL21(DE3) и очищали при помощи аффинной хроматографии на Ni-NTA.

Изучение физико-химических свойств проводилось методом собственной флуоресценции белка. Спектры флуоресценции измеряли при 25°C на спектрофлуориметре Cary Eclipse при $\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм. Для определения стабильности TTh-RimL (1,4 мкМ) при различных pH его инкубировали в течение 5 мин при 25°C в буфере следующего состава: 6 мкМ MES 6.5, 6 мкМ HEPES, 6 мкМ H₃BO₄, 6 мкМ глицин, 6 мкМ ацетат натрия, доведённом до pH от 3 до 12 с шагом

0,5. Для изучения устойчивости TTh-RimL к денатурирующим агентам проводили его разворачивание в гуанидин гидрохлориде (GdHCl) в градиенте концентрации от 0 до 6 М с шагом 0,5 М при 25°C в реакционной смеси: 50 mM MES 6.5, 150 mM NaCl, 0,66 мкМ RimL. Термостабильность TTh-RimL измеряли в градиенте температур от 20 до 98°C с шагом 2°C в реакционной смеси: 50 mM Na_2HPO_4 pH=8,1, 150 mM NaCl, 1 мкМ TTh-RimL.

Методом ацетилирования *in vitro* пептидов с разными остатками на N-конце определяли субстратную специфичность TTh-RimL. Ацетилирование проводили в 50 мкл смеси: 50 mM MES 6.5, 1 мкМ TTh-RimL, 100 мкМ АцКоА, 100 мкМ пептиды с N-концевыми Ala, Ser, Gly, инкубировали 1 ч при 60°C. Проверку уровня ацетилирования проводили при помощи реакции алдритиола с сульфгидрильной группой КоА, отслеживаемой по поглощению при длине волны 324 нм (λ_{324}). Измерение поглощения проводилось на BioTek Rider при 25°C, в течение 10 мин с интервалом 1 мин.

Результаты и их обсуждение

Ген *TTHA1799* (UniProt ID: Q5SHD1) бактерии *Thermus thermophilus* (BKM B-1605) клонирован в вектор pET-29. Разработана методика очистки фермента TTh-RimL, которая позволяет получать TTh-RimL до 50 мг/л культуры.

Методом собственной флуоресценции белка показано, что TTh-RimL не проявляет заметных pH-индуцируемых конформационных переходов белка в диапазоне pH от 4 до 12 (данные не представлены). Увеличение интенсивности флуоресценции (рис., А) свидетельствует о разворачивании молекул белка под действием GdHCl. Середина перехода TTh-RimL из нативного в денатурированное состояние, оценённая с использованием сигмоидальной функции, составляет 2,2 М GdHCl. График изменения интенсивности собственной флуоресценции на 304 нм при нагревании фермента (рис., Б) свидетельствует, что TTh-RimL является термостабильным (до 84°C) ферментом с серединой теплового перехода 88°C.

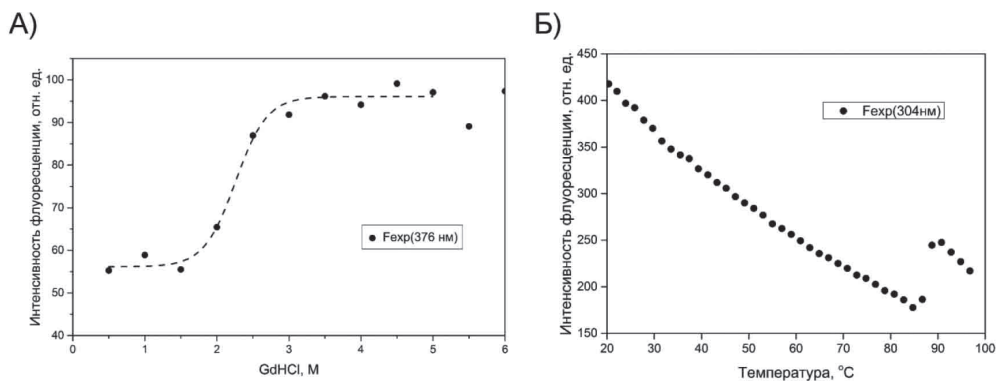


Рис. Параметры флуоресценции: А — изменение интенсивности собственной флуоресценции TTh-RimL на 376 нм от концентрации GdHCl; Б — изменение интенсивности собственной флуоресценции на 304 нм при повышении температуры.

Fig. Fluorescence parameters: А — change in the intrinsic fluorescence intensity of TTh-RimL at 376 nm from the GdHCl concentration; Б — change in the intensity of intrinsic fluorescence by 304 nm with increasing temperature.

В реакции ацетилирования пептидов показано, что фермент TTh-RimL проявляет специфическую функциональную активность, т. е. является NAT. Специфичность TTh-RimL в отношении пептидов снижается в ряду Ser → Gly → Ala.

Таким образом, нами получен термостабильный фермент, который может применяться в биотехнологии для ацетилирования белков и пептидов, предпочтительно с серином на N-конце, в широком диапазоне температур и в присутствии до 1,5 М GdHCl.

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;84(2):e00090-19. DOI: 10.1128/MMBR.00090-19
2. Chen J., Li H., Wang T., Sun S., Liu J., Chen J. Production of N(alpha)-acetyl Talphal-HSA through *in vitro* acetylation by RimJ. *Oncotarget*. 2017;8(56):95247–95255.
3. 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. DOI: 10.1128/MMBR.00020-15
4. Huang E., Yousef A.E. Biosynthesis of paenibacillin, a lantibiotic with N-terminal acetylation, by *Paenibacillus polymyxa*. *Microbiol. Res.* 2015;181:15–21. DOI: 10.1016/j.micres.2015.08.001
5. Johnson M., Coulton A.T., Geeves M.A., Mulvihill D.P. Targeted amino-terminal acetylation of recombinant proteins in *E. coli*. *PLoS One*. 2010;5(12):e15801. DOI: 10.1371/journal.pone.0015801
6. Kazakov T., Kuznedelov K., Semenova E., Mukhamedyarov D., Datsenko K.A., Metlitskaya A., Vondenhoff G.H., Tikhonov A., Agarwal V., Nair S., Van Aer-schot A., Severinov K. The RimL transacetylase provides resistance to translation inhibitor microcin C. *J. Bacteriology*. 2014;196(19):3377–3385. DOI: 10.1128/JB.01584-14
7. Ren J., Sang Y., Lu J., Yao Y.F. Protein acetylation and its role in bacterial virulence. *Trends Microbiol.* 2017;25(9):768–779. DOI: 10.1016/j.tim.2017.04.001
8. Vetting M.W., de Carvalho L.P., Roderick S.L., Blanchard J.S. A novel dimeric structure of the RimL N-acetyltransferase from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 2005;280:22108–22114. DOI: 10.1074/jbc.M502401200

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Трунилина Мария Викторовна*, Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”»;
e-mail: masha.trunilina@mail.ru

Вологжанникова Алиса Андреевна, к.б.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”»;
e-mail: lisiks.av@gmail.com

Кудряшов Тимофей Андреевич, Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”»;
e-mail: kudryashovtim@gmail.com

Maria V. Trunilina*, Institute of Biological Instrumentation of the Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”;
e-mail: masha.trunilina@mail.ru

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

Timofey A. Kudryashov, Institute of Biological Instrumentation of the Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”;
e-mail: kudryashovtim@gmail.com

Локтюшов Евгений Владимирович, Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”»;

e-mail: zhenyaloktushov@gmail.com

Eugene V. Loktyushov, Institute of Biological Instrumentation of the Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”;

e-mail: zhenyaloktushov@gmail.com

Быков Вячеслав Владимирович, Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”»;

e-mail: naggilan88@gmail.com

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

e-mail: naggilan88@gmail.com

Соколов Андрей Сергеевич, к.б.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”»;

e-mail: 212sok@gmail.com

Andrey S. Sokolov, Cand. Sci. (Biol.), Institute of Biological Instrumentation of the Federal Research Center “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 «Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”»;

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

Yulia S. Lapteva, Cand. Sci. (Biol.), Institute of Biological Instrumentation of the Federal Research Center “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