



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОГО ДИАПАЗОНА ТЕМПЕРАТУР ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МЕТИОНИН АМИНОПЕПТИДАЗЫ ИЗ *THERMUS THERMOPHILUS*

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

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

Отщепление N-концевого иницирующего метионина (Met1) затрагивает 50–70% клеточных белков и является важной посттрансляционной модификацией, которую катализируют специфические ферменты — метионин аминопептидазы (МАП). Рекомбинантные МАП из *E. coli* и человека применяют в научных исследованиях, а также в биотехнологии для удаления Met1 из рекомбинантных белков при их гетерологичной сверхэкспрессии в *E. coli*. Различия в субстратной специфичности и условиях функционирования известных МАП обуславливают поиск новых ферментов, способных работать при повышенных температурах. Нами клонирована МАП из гипертермофильной бактерии, разработана методика очистки фермента, исследована активность фермента в широком диапазоне температур. Нами показано, что МАП из *Thermus thermophilus* наиболее активна при температуре от 75 до 95°C. Новый фермент может быть использован для удаления N-концевого метионина из рекомбинантных белков *in vitro* в условиях повышенных температур.

Ключевые слова: метионин аминопептидаза, *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: Быков В.В., Вологжанникова А.А., Трунилина М.В., Кудряшов Т.А., Лаптева Ю.С., Соколов А.С. Определение оптимального диапазона температур функционирования метионин аминопептидазы из *Thermus thermophilus*. *Биомедицина*. 2024;20(3E):20–24. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-20-24>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 18.06.2024

Опубликована 01.11.2024

DETERMINATION OF AN OPTIMAL TEMPERATURE RANGE OF METHIONINE AMINOPEPTIDASE FROM *THERMUS THERMOPHILUS*

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

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

Removal of the N-terminal initiator methionine (Met1) affects 50–70% of cellular proteins, being an important post-translational modification. This modification is catalyzed by such specific enzymes as methionine aminopeptidases (MAP). Recombinant MAPs from *E. coli* and humans are used in scientific research, as well as in biotechnology to remove Met1 from recombinant proteins under their heterologous overexpression in *E. coli*. Differences in substrate specificity and operating conditions of known MAPs warrants the search for new enzymes capable of operating at elevated temperatures. We cloned an MAP from a hyperthermophilic bacterium, developed a method for purifying the enzyme, and studied the activity of the enzyme in a wide temperature range. We show that the MAP from *Thermus thermophilus* is most active at temperatures from 75 to 95°C. The new enzyme can be used to remove N-terminal methionine from recombinant proteins *in vitro* 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: research was funded by the Russian Science Foundation, grant No. 23-24-00563.

For citation: Bykov V.V., Vologzhannikova A.A., Trunilina M.V., Kudryashov T.A., Lapteva Yu.S., Sokolov A.S. Determination of an Optimal Temperature Range of Methionine Aminopeptidase from *Thermus thermophilus*. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):20–24. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-20-24>

Submitted 15.04.2024

Revised 18.06.2024

Published 01.11.2024

Введение

Метионин аминокептидазы (МАП) — ферменты, которые специфически удаляют инициаторный N-концевой метионин (Met1) из растущей полипептидной цепи в процессе биосинтеза белка в клетках [5]. МАП эукариот участвуют в ангиогенезе и рассматриваются в качестве мишеней для лечения онкологических заболеваний [8]. Механизмы ингибирования МАП патогенных бактерий рассматривают в качестве альтернативы антибиотикам [6]. Рекombинантные МАП из *E. coli* и человека применяют в научных исследованиях, а также в биотехнологии для удаления Met1 из рекомбинантных белков при их гетерологичной сверхэкспрессии в *E. coli*, поскольку удаление Met1 из белка часто имеет решающее значение в поддержании его стабильности и функции [1, 2, 4, 7]. Имеющиеся в настоящее время коммерчески доступные МАП *E. coli* и человека обладают ограниченной специфичностью и условиями проведения реакций. В этой связи актуальна идентификация МАП, спо-

собных работать в условиях повышенных температур и широкого диапазона pH.

Ранее нами была клонирована новая МАП из *Thermus thermophilus* и при помощи биофизических методов установлено, что фермент стабилен в широком диапазоне pH и устойчив к повышению температур с серединой полуперевода металл-связанной формы при 92°C [1]. Однако специфическая функциональная активность фермента при разных температурах не была нами исследована.

Целью данной работы является изучение температурного оптимума функционирования метионин аминокептидазы из гипертермофильной бактерии *Thermus thermophilus*.

Материалы и методы

Метионин аминокептидаза (GenBank: TTH_RS08450) *Thermus thermophilus* HB8 (BKM B-1605) получена, как описано ранее [1]. Функциональную активность МАП измеряли с помощью специфиче-

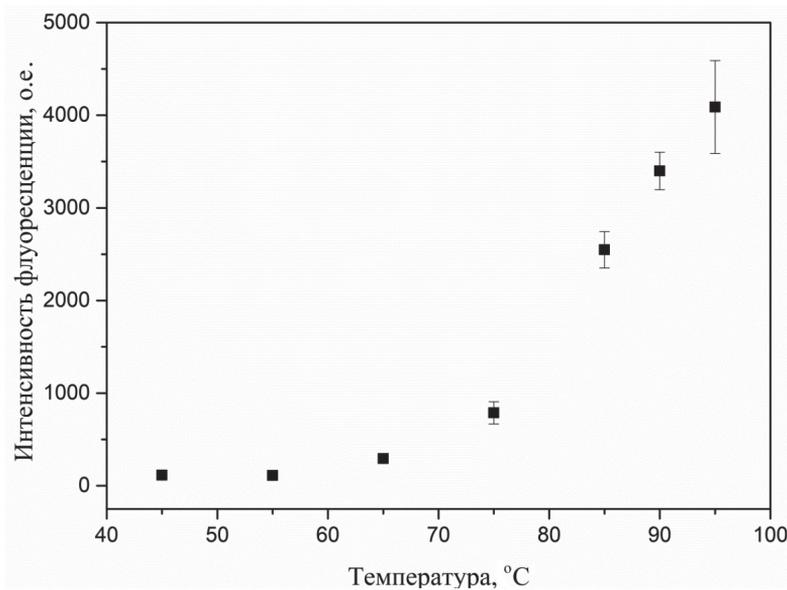


Рис. Активность МАП в отношении Met-AMC при различных температурах.
Fig. MAP activity toward Met-AMC at different temperatures.

ского флуорогенного субстрата для пептидаз L-метионин 7-амино-4-метилкумарин (Met-AMC). При отщеплении метионина 7-амино-4-метилкумарин флуоресцирует (длина волны возбуждения — 380 нм, эмиссии — 460 нм). Для анализа активности МАП 100 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ боратный буфер, pH=8,3, 150 мМ KCl, 100 мкМ CoCl₂, 1 мкМ МАП и 200 мкМ Met-AMC, выдерживали в течение 30 мин в диапазоне температур от 45–95°C с шагом в 10 градусов. Реакцию останавливали добавлением хелатора ЭДТА. Отслеживание эмиссии флуоресценции высвободившихся свободных AMC осуществляли с использованием ридера для планшетов BioTek Synergy H1 и черных 384-луночных планшетов Greiner Bio-One #781906. Измерения проводили при температуре 25°C в течение 10 мин, с орбитальным встряхиванием перед каждым измерением. Для каждой температуры измерения проводились в трёх повторах

и был поставлен контроль — реакционная смесь без МАП, который вычитался из опытных реакций при обработке результатов. Обработку результатов и построение графиков проводили при помощи программы OriginPro 8.0.

Результаты и их обсуждение

L-метионин 7-амино-4-метилкумарин (Met-AMC) (наряду с L-метионин паранитроанилидом, Met-pNA) является самым популярным субстратом для исследования функциональной активности МАП в различных условиях (температура, pH, катионы металлов и др.). Результаты проверки активности МАП при различных температурах представлены на рисунке в виде зависимости уровня флуоресценции 7-амино-4-метилкумарина от температуры. Как видно из рисунка, уровень флуоресценции при температурах от 45–65°C значительно ниже, чем при 75–85°C, и достигает максимума к 90–95°C. Результаты свидетельствуют

о том, что максимальную активность фермент проявляет при температуре 90–95°C.

Выводы

Проведённые 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 диапазоне температур 75–95°C.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. 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. [Lapteva Yu.S., Bykov V.V., Trunilina M.V., Boldaevsky I.S., Kudryashov T.A., Vologzhannikova A.A., Sokolov A.S. Poluchenie sverkhstabil'noy metionin-aminopeptidazy dlya udale-niya metionina iz re-kombinantnykh belkov [Obtaining overstable methionine aminopeptidase for the removal of methionine from recombinant proteins]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2023;19(3E):47–51. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-19-3E-47-51
2. Adachi K., Yamaguchi T., Yang Y., Konitzer P.T., Pang J., Reddy K.S., Ivanova M., Ferrone F., Surrey S. Expression of functional soluble human alpha-globin chains of hemoglobin in bacteria. *Protein Exp. Purif.* 2000;20(1):37–44. DOI: 10.1006/prep.2000.1277
3. Boix E., Wu Y., Vasandani V.M., Saxena S.K., Ardelit W., Ladner J., Youle R.J. 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. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0218
4. Endo S., Yamamoto Y., Sugawara T., Nishimura O., Fujino M. The additional methionine residue at the N-terminus of bacterially expressed human interleukin-2 affects the interaction between the N- and C-termini. *Biochemistry*. 2001;40(4):914–919. DOI: 10.1021/bi001170r
5. Giglione C., Boularot A., Meinel T. Protein N-terminal methionine excision. *Cell Mol. Life Sci.* 2004;61(12):1455–1474. DOI: 10.1007/s00018-004-3466-8
6. Helgren T.R., Chen C., Wangtrakuldee P., Edwards T.E., Staker B.L., Abendroth J., Sankaran B., Housley N.A., Myler P.J., Audia J.P., Horn J.R., Hagen T.J. 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
7. Liao Y.D., Wang S.C., Leu Y.J., Wang C.F., Chang S.T., Hong Y.T., Pan Y.R., Chen C. 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. DOI: 10.1093/nar/gkg746
8. Selvakumar P., Lakshmikuttyamma A., Dimmock J.R., Sharma R.K. Methionine aminopeptidase 2 and cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1765(2):148–154. DOI: 10.1016/j.bbcan.2005.11.001

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Быков Вячеслав Владимирович, Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН»;
e-mail: naggilan88@gmail.com

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

Vyacheslav V. Bykov, Institute of Biological Instrumentation, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: naggilan88@gmail.com

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

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

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

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

Timofey A. Kudryashov, Institute of Biological Instrumentation, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: kudryashovtimm@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, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: yulia.s.lapteva@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, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: 212sok@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author