

Исследование специфичности новой метионин аминопептидазы для биотехнологии удаления иницирующего метионина из рекомбинантных белков

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

Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований»
РАН, Институт биологического приборостроения, Пушкино, Россия

* yulia.s.lapteva@gmail.com

Ключевые слова: метионин аминопептидаза; металл-связывающие белки; гетерологичная экспрессия; удаление N-концевого метионина

Мотивация и цель: Отщепление N-концевого инициаторного метионина (iMet) из полипептидной цепи является главной ко- и пост-трансляционной модификацией, охватывающей до 80 % протеома клеток, которая осуществляется специфическими ферментами – метионин аминопептидазами (МАП) [1]. Существенной проблемой в биотехнологии получения рекомбинантных белков, при их гетерологичной экспрессии в *E. coli*, является неполное удаление iMet, что приводит к неправильной укладке белков (агрегации, амилоидозации) [2], изменению времени их полужизни, потере активности, иммуногенности и др. [3–5]. Для решения этой проблемы применяют технологию обработки целевых рекомбинантных белков ферментами МАП, как в условиях *in vitro*, так и при помощи ко-экспрессии [6–8]. МАП из разных организмов являются металл-зависимыми протеазами и имеют схожую трехмерную укладку, но отличаются субстратной специфичностью и условиями функционирования. Имеющиеся в настоящее время коммерческие МАП человека, *E. coli* и *P. furiosus* не обеспечивают всего разнообразия специфичностей и условий, востребованных в биотехнологии удаления iMet из рекомбинантных белков [9, 10]. В этой связи актуален поиск новых МАП, стабильных в «нестандартных» условиях (повышенных температур, pH, в присутствии денатурантов и др.). Цель данной работы заключалась в исследовании субстратной специфичности новой МАП из бактерии *Thermus thermophilus* (Tth-МАП) с использованием синтетических пептидов.

Методы и алгоритмы: Клонирование и очистку фермента Tth-МАП проводили как описано ранее [11]. Для определения субстратной специфичности Tth-МАП использовали синтетические пептидные субстраты, отличающиеся по аминокислотному остатку после iMet. Реакцию гидролиза пептидов проводили при 60 °C в течение часа в 50 мкл реакционной смеси следующего состава: 50 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM кобальт, 200 мкМ пептида, 2 мкМ Tth-МАП. Реакцию останавливали добавлением 1 mM ЭДТА. Степень гидролиза пептидов оценивали при помощи масс-спектрометрии на масс-спектрометрическом детекторе с электрораспылительной ионизацией (ESI-MS) Shimadzu Corporation, LCMS-2010EV (Shimadzu Co., Япония). Калибровку прибора проводили с использованием мио-

глубина сердца лошади (Sigma-Aldrich Co., США). Молекулярные массы белковых фракций анализировали при помощи программного обеспечения GPMW 9.02 [12].

Результаты: Одной из главных характеристик фермента является его субстратная специфичность. Специфичность МАП варьирует от организма к организму, может меняться в зависимости от связанного катиона металла, но в целом она ограничивается радиусом боковой цепи аминокислотного остатка (а. о.) стоящего за отщепляемым iMet. Обычно это небольшие, незаряженные а. о., такие как Gly, Ala, Ser, Thr, Pro, Val, Cys. В данной работе мы исследовали субстратную специфичность нового фермента МАП из термофильной бактерии *Thermus thermophilus*, а именно провели оценку эффективности отщепления Met из синтетических пептидов. Для стимуляции активности Tth-МАП использовали ионы кобальта (100 мкМ). Анализ показал, что эффективность отщепления Met, за которым находятся Gly и Ala составляет 95 %, в то время как для Thr 15 %. Новый фермент Tth-МАП специфичен к отщеплению Met в пептидах преимущественно с Gly и Ala на N-конце.

Выводы: Впервые изучена субстратная специфичность нового фермента МАП из бактерии *T. thermophilus*. Новый фермент может применяться в биотехнологии для удаления N-концевого метионина из рекомбинантных белков и пептидов.

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00563, <https://rscf.ru/project/23-24-00563/>.

Study of the specificity of a new methionine aminopeptidase for the biotechnology of removing initiating methionine from recombinant proteins

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

Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research" RAS,
Institute of Biological Instrumentation, Pushchino, Russia

* yulia.s.lapteva@gmail.com

Key words: methionine aminopeptidase; metal-binding proteins; heterologous expression; removal of N-terminal methionine

Motivation and Aim: The cleavage of N-terminal initiator methionine (iMet) from the polypeptide chain is the main co- and post-translational modification, covering up to 80 % of the cell proteome, which is carried out by specific enzymes – methionine aminopeptidases (MAP) [1]. A significant problem in the biotechnology of producing recombinant proteins, with their heterologous expression in *E. coli*, is the incomplete removal of iMet, which leads to incorrect protein folding (aggregation, amyloidization) [2], changes in their half-life, loss of activity, immunogenicity, etc. [3–5]. To solve this problem, the technology of processing target recombinant proteins with MAP enzymes is used, both *in vitro* and using co-expression [6–8]. MAPs from different organisms are metal-dependent proteases and have similar three-dimensional folding, but differ in substrate specificity and operating conditions. Currently available commercial MAPs

from humans, *E. coli* and *P. furiosus* do not provide the full variety of specificities and conditions required in the biotechnology of removing iMet from recombinant proteins [9, 10]. In this regard, the search for new MAPs that are stable under “non-standard” conditions (elevated temperatures, pH, in the presence of denaturants, etc.) is relevant. The purpose of this work was to study the substrate specificity of a new MAP from the bacterium *Thermus thermophilus* (Tth-MAP) using synthetic peptides.

Methods and Algorithms: Cloning and purification of the Tth-MAP enzyme was carried out as described previously [11]. To determine the substrate specificity of Tth-MAP, synthetic peptide substrates differing in the amino acid residue after iMet were used. The peptide hydrolysis reaction was carried out at 60 °C for an hour in 50 µl of a reaction mixture of the following composition: 50 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM cobalt, 200 µM peptide, 2 µM Tth-MAP. The reaction was stopped by adding 1 mM EDTA. The degree of peptide hydrolysis was assessed using mass spectrometry using an electrospray ionization mass spectrometry detector (ESI-MS) Shimadzu Corporation, LCMS-2010EV (Shimadzu Co., Japan). The device was calibrated using horse heart myoglobin (Sigma-Aldrich Co., USA). The molecular weights of protein fractions were analyzed using GPMW 9.02 software [12].

Results: One of the main characteristics of an enzyme is its substrate specificity. The specificity of MAP varies from organism to organism and may vary depending on the metal cation bound, but in general it is limited by the side chain radius of the amino acid residue (a. a.) behind the iMet being cleaved off. Usually these are small, uncharged a. a., such as Gly, Ala, Ser, Thr, Pro, Val, Cys. In this work, we investigated the substrate specificity of the new MAP enzyme from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*, namely, we assessed the efficiency of Met cleavage from synthetic peptides. Cobalt ions (100 µM) were used to stimulate Tth-MAP activity. The analysis showed that the efficiency of elimination of Met, followed by Gly and Ala, is 95 %, while for Thr it is 15 %. The new Tth-MAP enzyme is specific for Met cleavage in peptides predominantly with Gly and Ala at the N-terminus.

Conclusion: The substrate specificity of the new MAP enzyme from the bacterium *T. thermophilus* was studied for the first time. The new enzyme can be used in biotechnology to remove N-terminal methionine from recombinant proteins and peptides.

Funding: research was funded by a grant from the Russian Science Foundation, No. 23-24-00563, <https://rscf.ru/project/23-24-00563/>.

Список литературы/References

1. Gamberdinger M., Deuerling E. Cotranslational sorting and processing of newly synthesized proteins in eukaryotes. *Trends Biochem Sci.* 2024;49(2):105-118
2. Patke S. et al. Characterization of the oligomerization and aggregation of human Serum Amyloid A. *PLoS One.* 2013;8(6):e64974
3. Liu B. et al. Removal of the N-terminal methionine improves the sweetness of the recombinant expressed sweet-tasting protein brazzein and its mutants in *Escherichia coli*. *J Food Biochem.* 2020;45(3):e13354
4. Nguyen K.T. et al. 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
5. Arif A., Mohammed K., Nadeem M.S. 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
6. Nandan A., Nampoothiri K.M. Therapeutic and biotechnological applications of substrate specific microbial aminopeptidases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(12):5243-52577
7. Liao Y.D. et al. Removal of N-terminal methionine from recombinant proteins by engineered *E. coli* methionine aminopeptidase. *Protein Sci.* 2004;13(7):1802-1810

8. Hwang D.D. et al. Co-expression of glutathione S-transferase with methionine aminopeptidase: a system of producing enriched N-terminal processed proteins in *Escherichia coli*. *Biochem J.* 1999;338(Pt. 2):335-342
9. Meng L. et al. Overexpression and divalent metal binding properties of the methionyl aminopeptidase from *Pyrococcus furiosus*. *Biochemistry.* 2002;41(23):7199-208
10. Roderick S.L., Matthews B.W. Structure of the cobalt-dependent methionine aminopeptidase from *Escherichia coli*: a new type of proteolytic enzyme. *Biochemistry.* 1993;32(15):3907-3912
11. Lapteva Y.S. et al. Obtaining overstable methionine aminopeptidase for the removal of methionine from recombinant proteins. *J Biomed.* 2023;19(3 E):47-51
12. Peri S., Steen H., Pandey A. GPMAW – a software tool for analyzing proteins and peptides. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(11):687-689