

Лигирование OaAEP1 и SrtA в мембраноподобном окружении

Савицкая А.*, Гончарук С.

ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина

и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва, Россия

* sanna3061@gmail.com

Ключевые слова: лигирование; мембранные белки; OaAEP1; SrtA; мембраноподобное окружение

Мотивация и цель: Селективное лигирование двух или более белков-субстратов представляет подход, который позволяет получить продукт в обход рибосомального синтеза. Такой метод синтеза позволяет облегчить получение токсичных полипептидов большого размера, белков с трансмембранными доменами и сделать возможным сегментное мечение доменов полипептидов, которое позволит охарактеризовать структурные характеристики белка с помощью ЯМР. Одним из методов лигирования является использование ферментов аспарагинилэндопептидазы (OaAEP1) и сортазы A (SrtA). В данной работе мы проводим сравнение активности лигирования OaAEP1 и SrtA при лигировании водорастворимых белков и белков-субстратов, один из которых является трансмембранным и требует наличия мембранного окружения.

Методы и алгоритмы: Пептидазы AEP1 из гена *Oldenlandia affinis* (OaAEP1) (UniProtKB: A0A0N9JZ32_OLDADF) и кальций-независимый мутант сортазы A *Staphylococcus aureus* SrtA (Addgene: 105602) были экспрессированы в клетках BL21(DE3) *E. coli* и очищены с помощью металлохелатной хроматографии [1, 2]. Очищенный OaAEP1 был активирован перед проведением лигирования [3]. Конструкции модельных белков-субстратов Smt3 и p75TM содержат “NAL” на С-конце, p75ICD содержит “GL” на N-конце для проведения лигирования с помощью OaAEP1. Для лигирования с помощью SrtA конструкции Smt3 и p75TM содержали “LPETG” на С-конце, p75ICD содержал “GG” на N-конце. Модельные белки Smt3 и p75ICD также были получены в клетках BL21(DE3) *E. coli* и очищены с применением металлохелатной хроматографии. P75TM был получен в бесклеточной среде и очищен с помощью гельфильтрации в 0.5 % детергента лаурилсаркозинат натрия и переосажден [4]. Для проведения лигирования белки-субстраты смешивали в равном соотношении (0.02 мМ). В качестве мембраноподобного окружения были протестированы мицеллы, образованные DDM, CHAPS и бицеллы DMPC/CHAPS, DMPC/DHPC, DMPC/facade-EM, DMPC/facade-TEM, DMPC/facade-EPC, DMPC/facade-TEG, DMPC/facade-TFA1.

Результаты: Пептидазы SrtA и OaAEP1 имели схожую эффективность лигирования водорастворимых белков-субстратов Smt3 и p75ICD, которая не превышала 50 % от белков-субстратов. Однако при лигировании SrtA наблюдалось более интенсивное образование дополнительных продуктов лигирования по сравнению с OaAEP1. Лигирование трансмембранного белка-рецептора нейротрофина p75^{NTR} (p75TM) с его внутриклеточным доменом (p75ICD) проводилось в мембранном окружении. Наибольший выход лигированного p75TM-ICD, сопоставимый с выходом при лигировании водорастворимых белков-субстратов, был получен в

мицеллах, сформированных DDM при лигировании OaAEP1. Наименьшее количество лигированного продукта при лигировании OaAEP1 было в мицеллах, образованных CHAPS, а также бицеллами DMPC/CHAPS, DMPC/DHPC и DMPC/фасад-ЕРС. Эффективность лигирования сортазой А (SrtA) в мембрано-подобной среде была ниже по сравнению с OaAEP1.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФ (№ 22-14-00130).

OaAEP1 and SrtA ligation in a membrane-like environment

Savitskaya A.*, Goncharuk S.

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

* *sanna3061@gmail.com*

Key words: ligation; membrane proteins; OaAEP1; SrtA

Motivation and Aim: Selective ligation of two or more substrate proteins represents an approach that bypasses ribosomal synthesis to obtain proteins. Ligation makes it easier to obtain large toxic polypeptides, proteins with transmembrane domains, and segmentally labeling of polypeptide domains, which will allow characterizing the structural characteristics of the protein by NMR. One of the ligation methods is the use of the enzymes as asparaginyl endopeptidase (OaAEP1) and sortase A (SrtA). We compare the efficiency of ligation by OaAEP1 and SrtA by using as an substrates a water-soluble proteins and membrane protein that requires a membrane environment.

Methods and Algorithms: AEP1 from the *Oldenlandia affinis* (OaAEP1) (UniProtKB: A0A0N9JZ32_OLDADF) and calcium-independent sortase A mutant *Staphylococcus aureus* SrtA (Addgene: 105602) were expressed in BL21(DE3) *E. coli* cells and purified by IMAC [1, 2]. Constructs of substrate proteins Smt3 and p75TM contains “NAL” at the C-terminus, p75ICD contains “GL” at the N-terminus for ligation by OaAEP1 [3]. Ligation by SrtA is generated with constructs Smt3 and p75TM contained “LPETG” at the C-terminus, p75ICD contained “GG” at the N-terminus. Smt3 and p75ICD were also produced in BL21(DE3) *E. coli* competent cells and purified using IMAC. P75TM was expressed by *cell-free protein synthesis* and purified by gel filtration at 0.5 % lauryl sarcosinate and precipitated [4]. The substrate proteins for ligation were mixed in equal proportions (0.02 mM). Membrane mimic environment were formed by DDM, CHAPS and bicelles DMPC/CHAPS, DMPC/DHPC, DMPC/facade-EM, DMPC/facade-TEM, DMPC/facade-EPC, DMPC/facade-TEG, DMPC/facade-TFA1.

Results: The peptidases SrtA and OaAEP1 had similar ligation efficiency in case of water-soluble substrate proteins Smt3 and p75ICD ligation, which did not exceed 50 % of the substrate proteins. However, upon ligation by SrtA, a more intense formation of additional ligation products was observed compared to OaAEP1. Ligation of the transmembrane neurotrophin receptor protein p75^{NTR} (p75TM) with its intracellular domain (p75ICD) was carried out in a membrane-mimic environment. The highest yield of ligated p75TM-ICD, comparable to the yield from ligation of water-soluble substrate proteins, was obtained in micelles formed by DDM at ligation generated by OaAEP1. The smallest amount of ligated product during OaAEP1 ligation was in micelles formed by CHAPS, as well as DMPC/CHAPS, DMPC/DHPC and DMPC/facade-EPC bicelles.

The efficiency of ligation by sortase A (SrtA) in the membrane-like environment of BA is lower compared to OaAEP1.

Funding: The study is supported by Russian Science Foundation (No. 22-14-00130).

Список литературы/References

1. Harris K., Durek T., Kaas Q. et al. Efficient backbone cyclization of linear peptides by a recombinant asparaginyl endopeptidase. *Nat Commun.* 2015;6:10199. doi 10.1038/ncomms10199
2. Wu Z., Guo X., Gao J., Guo Z. Sortase A-mediated chemoenzymatic synthesis of complex glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. *Chem Commun.* 2013;49(99):11689
3. Dall E., Brandstetter H. Mechanistic and structural studies on legumain explain its zymogenicity, distinct activation pathways, and regulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(27):10940-10945. doi 10.1073/pnas.1300686110
4. Schwarz D., Junge F., Durst F. et al. Preparative scale expression of membrane proteins in Escherichia coli-based continuous exchange cell-free systems. *Nat Protoc.* 2007;2:2945-2957. doi 10.1038/nprot.2007.426