

DOI: 10.12731/2658-6649-2025-17-2-1121

EDN: PJYJXI

УДК 577.151+579.66+ 579.258



Научная статья

«PROBABLE ACETYLTRANSFERASE» TTHA1209 БАКТЕРИИ *THERMUS THERMOPHILUS*: КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА, СТРУКТУРНЫЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФЕРМЕНТА

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

Аннотация

Обоснование. За последнюю декаду N-ацетилтрансферазы (АТ) бактерий стали объектами интенсивного изучения, поскольку участвуют в биосинтезе/инактивации антибиотиков; образуют систему «токсин-антитоксин»; а статус ацетилирования белков и пептидов оказывает влияние на их вирулентность и патогенность. Ферменты АТ обладают низким процентом идентичности аминокислотных последовательностей, что затрудняет их идентификацию и аннотацию в геномах. В этой связи **цель данной работы** заключалась в структурном и функциональном анализе новой «предполагаемой» ацетилтрансферазы («probable acetyltransferase»), кодируемой открытой рамкой считывания (ОРС) TTHA1209 бактерии *T. thermophilus*.

Материалы и методы. Структурный анализ фермента проводили методами биоинформатики. Для клонирования ОРС TTHA1209 использовали методы генной инженерии. Для очистки белка применяли аффинную хроматографию. Проверку активности белка проводили в реакции *in vitro* ацетилирования модельного белка парвальбумина (ПА). Оценку включения ацетильной группы на N-конец парвальбумина проводили при помощи масс-спектрометрии.

Результаты. Установлено, что TTHA1209 содержит в своей структуре единственный GNAT-домен и обладает характерным для N-концевых АТ (NAT) чередованием элементов вторичных структур и трёхмерной укладкой. Исследовано сходство структуры фермента TTHA1209 с белками-ортологами из *E. coli*. Наибольший процент идентичности TTHA1209 наблюдается с ферментом RimI (27%). Показано, что фермент TTHA1209 ацетилюет парвальбумин, т.е. проявляет специфическую Na-ацетилтрансферазную активность.

Закключение. Новый фермент TTHA1209 бактерии *T. thermophilus* на всех уровнях организации проявляет свойства, характерные для NAT, обладает специфической активностью, и может быть аннотирован в геноме как N-концевая ацетилтрансфераза. Полученные результаты создают предпосылки для дальнейшего исследования субстратной специфичности и биохимических свойств новой NAT TTHA1209, что откроет перспективы его использования в биотехнологии для ацетилирования белков и пептидов.

Ключевые слова: N-концевые ацетилтрансферазы; GNAT-токсин; микроцин C; антибиотикорезистентность; спермидин; серотонин

Для цитирования. Кудряшов, Т. А., Локтюшов, Е. В., Трунилина, М. В., Быков, В. В., Соколов, А. С., & Лаптева, Ю. С. (2025). «Probable acetyltransferase» TTHA1209 бактерии *Thermus thermophilus*: клонирование гена, структурный и функциональный анализ фермента. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 17(2), 295-314. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2025-17-2-1121>

Original article

“PROBABLE ACETYLTRANSFERASE” TTHA1209 *THERMUS THERMOPHILUS* BACTERIA: GENE CLONING, STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE ENZYME

***T.A. Kudryashov, E.V. Loktyushov, M.V. Trunilina,
V.V. Bykov, A.S. Sokolov, Yu.S. Lapteva***

Abstract

Background. In the last decade, bacterial N-acetyltransferases (ATs) have been intensively studied because they are involved in the biosynthesis/inactivation of antibiotics, form the “toxin-antitoxin” system and the acetylation status of proteins and peptides influences their virulence and pathogenicity. AT enzymes have a low percentage of amino acid sequence identity, which complicates their identification and annotation in genomes. In this regard, **the aim of this work** was the structural and functional analysis of a new “probable” acetyltransferase encoded by the open reading frame (ORF) *TTHA1209* of the bacterium *T. thermophilus*.

Materials and methods. Structural analysis of the enzyme was carried out using bioinformatics methods. Genetic engineering methods were used to clone the TTHA1209 gene. Affinity chromatography was used to purify the protein. The protein activity was tested in an *in vitro* reaction of acetylation of the model protein

parvalbumin (PA). The incorporation of an acetyl group at the N-terminus of PA was evaluated by mass spectrometry.

Results. It was found that TTHA1209 share single GNAT domain in its structure and exhibits the alternation of secondary structure elements and three-dimensional folding characteristic of N-terminal At (NAT). The similarity of the structure of the TTHA1209 enzyme with orthologous proteins from *E. coli* was investigated. The highest percentage identity of TTHA1209 is observed with the RimI enzyme (27%). It has been shown that the TTHA1209 enzyme acetylates parvalbumin, i.e. has a specific N α -acetyltransferase activity.

Conclusion. The new enzyme TTHA1209 from the bacterium *T. thermophilus* exhibits properties characteristic of NAT at all levels of organization, has a specific activity and can be annotated in the genome as an N-terminal acetyltransferase. The results obtained create the prerequisites for further investigation of the substrate specificity and biochemical properties of the new NAT TTHA1209, which will open up prospects for its use in biotechnology for the acetylation of proteins and peptides.

Keywords: N-terminal acetyltransferases; GNAT-toxin; microcin C; antibiotic resistance; spermidine; serotonin

For citation. Kudryashov, T. A., Loktyushov, E. V., Trunilina, M. V., Bykov, V. V., Sokolov, A. S., & Lapteva, Yu. S. (2025). "Probable acetyltransferase" TTHA1209 *Thermus thermophilus* bacteria: Gene cloning, structural and functional analysis of the enzyme. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 17(2), 295-314. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2025-17-2-1121>

Введение

N-концевые ацетилтрансферазы (NAT) – внутриклеточные ферменты, которые катализируют перенос ацетильной группы от ацетил-коэнзима А на N α -аминогруппу различных субстратов [10]. N α -ацетилирование (N α -Ац) затрагивает до 28% протеома бактерий и архей. За последнюю декаду NAT бактерий стали объектами интенсивного изучения, ввиду их вовлеченности в различные клеточные процессы [12; 25; 32]. Ферменты NAT участвуют как в биосинтезе, так и инактивации антибиотиков [13; 15], N-ацетилирование полиаминов (спермин, кадаверин, путресцин) является начальной стадией их деградации [18], N α -ацетилирование белков (в том числе факторов патогенности) и пептидов (в том числе антимикробных) оказывает влияние на их активность, структуру и функции [7; 8; 20; 22]. NAT бактерий рассматривают в качестве ферментов, вовлеченных в адаптацию бактерий к экстремальным условиям обитания [29]. Ферменты NAT *E.coli* находят применение в биотехнологии и лабораторной практике для

направленного Nα-ацетилирования рекомбинантных белков и пептидов [11; 17; 30].

Геномы бактерий содержат до 72 открытых рамок считывания (ОРС), предположительно кодирующих различные ацетилтрансферазы (АТ), однако функция большинства из них не подтверждена. Так, например, из 29 ОРС АТ бактерии *E.coli* функция восьми АТ не установлена [3]. Наиболее изученными на сегодняшний день NAT из *E.coli* являются RimJ, RimL и RimI.

Фермент RimJ *E.coli* участвует в ацетилировании белков преимущественно с Ser и Thr, реже с Ala на N-конце [1; 32]. Помимо ацетилирования белков RimJ участвует в сборке рибосомы, а также выступает в качестве транскрипционного регулятора *pap*-оперона в уropатогенных штаммах *E. coli* [1; 2; 31; 36; 37].

Для фермента RimL предпочтительнее белки с Ser N-конце, тогда как замена Ser на Ala приводит к снижению эффективности ацетилирования белка на 25-50% [21; 34]. Помимо ацетилирования белков, RimL *E. coli* участвует в ацетилировании микроцина C, что обеспечивает клеткам устойчивость к последнему [15].

RimI в *E.coli* специфично ацетилирует N-концевой Ala рибосомального белка S18 [38], N-концевой Ser фактора элонгации Tu [29], серотонин и 5-метокситриптамиин [19]. Работы последних лет показывают, что фермент RimI *E. coli* участвует в ацетилировании боковых лизинов, т.е. является лизин-ацетилтрансферазой (КАТ) (КАТ) [6; 29; 33; 38]. Фермент RimI из *M. tuberculosis* проявляет широкую субстратную специфичность, схожую с эукариотическими NatA, NatC, and NatE [26]. Мутанты по *rimI* в *M. smegmatis* проявляют в 16 раз повышенную устойчивость к антибиотику изониазиду [25].

Ферменты NAT относятся к суперсемейству GNAT-ацетилтрансфераз (GNAT-AT). GNAT-AT представляют собой белки, характеризующиеся низкой идентичностью аминокислотных последовательностей, но высоко консервативной пространственной укладкой элементов вторичных структур (GNAT-fold). GNAT-укладка организована из 4 альфа-спиралей и 7 β-листов следующим образом β0-β1-α1-α2-β2-β3-β4-α3-β5-α4-β6. Активный сайт ферментов имеет V-образную конфигурацию, образованную двумя параллельными складками β4-β5. За связывание ацетил-КоА отвечает консервативный мотив, называемый «Р-петлей», который состоит из шести аминокислот, амиды которых образуют водородные связи с атомами кислорода фосфата ацетил-КоА. Мотив имеет вид Q/R-X-X-G-X-G/A и локализован в петле между β4-складкой и α3-спиралью [35].

GNAT-АТ могут содержать только GNAT-домен (N-концевые АТ и лизин-АТ); могут содержать более чем один GNAT-домен (аминогликозид-АТ) [5], а также ряд других доменов [9]. Архитектура GNAT-домена может несколько меняться от фермента к ферменту, обеспечивая тем самым то великое разнообразие субстратов, подвергающихся ацетилированию [4]. На сегодняшний день, однако, нет четкого понимания молекулярных основ субстратной специфичности и возможности предсказания активности фермента на основании его последовательности или структуры.

Ранее нами были разработаны критерии идентификации NAT в геномах, что позволило выявить в геноме бактерии *T. thermophilus* HB8 шесть «предполагаемых» NAT из 14 аннотированных «ацетилтрансфераз» [16]. Для одной из них, а именно продукта гена *TTHA1209*, решена кристаллическая структура (<https://doi.org/10.2210/pdb2CY2/pdb>), на основании которой белок и был аннотирован как «probable acetyltransferases». Однако отсутствуют данные о возможной функциональной активности фермента и его дальнейшей классификации.

Цель данного исследования заключалась в анализе структурной организации фермента *TTHA1209* и подтверждении его $\text{N}\alpha$ -ацетилтрансферазной активности.

Материалы и методы

Штаммы бактерий, плазмиды и условия культивирования. В качестве источника гена *TTHA1209* использовали геномную ДНК бактерии *T. thermophilus* HB8 Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ В-1605). *T. thermophilus* выращивали при 60°C при интенсивной аэрации со скоростью 180 об/мин в шейкере-инкубаторе или на чашках со средой Thermus ruber (5,0 г пептона, 1,0 г дрожжевого экстракта, 1,0 г крахмала), агаризованной 1,2% бакто-агаром в течение 16 часов. Геномную ДНК *T. thermophilus* HB8 (идентификатор генома GenBank: AP008226.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AP008226.1>) получали при помощи коммерческого набора для выделения геномной ДНК (Евроген).

Штаммы *E. coli* *E. coli* (F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) endA1 recA1 Φ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 araD139 Δ (ara,leu)7697 galU galK rpsL nupG λ -tonA (StrR)) и BL21(DE3) (fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS λ DE3 = λ sBamHI Δ EcoRI-B int::lacI::PlacUV5::T7 ген1) i21 Δ in5) использовали в качестве хозяев для генетических манипуляций с плазмидами и для сверхэкспрессии белка, соответственно. Штаммы *E. coli* выращивали при 37°C в среде LB с добавлением канамицина (25 мг/л) для селекции в течение 16 часов.

Плазмиду pET-29 использовали для клонирования и экспрессии в *E.coli* BL21(DE3) OPC *TTHA1209 T. thermophilus*.

Биоинформатический анализ TTHA1209. Анализ аминокислотной последовательности с целью определения параметров белка TTHA1209 (изо-электрическая точка, молекулярный вес и прочее) проводили при помощи программы ProtParam <https://www.protparam.net/index.html>. Множественное выравнивание аминокислотной последовательности TTHA1209 с белками-ортологами из других микроорганизмов осуществляли при помощи программы Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/).

Клонирование гена TTHA1209. Ген *TTHA1209* (идентификатор гена NCBI: 3169039) был амплифицирован из геномной ДНК *T. thermophilus* с помощью ПЦР с использованием праймеров 5-T AAGGGTAACATATG GTGCGGATCCGTAGGGC-3 и 5- TTTATGCTCGAGCCACTTATGCCCC CCTAGGTC-3 на приборе MJ Mini thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Ген был клонирован под контроль промотора фага T7 в вектор pET-29 между сайтами рестрикции *NdeI* и *XhoI*. Нуклеотидные последовательности плазмид подтверждали рестрикционным анализом и автоматическим секвенированием ДНК вставок. Полученная плазида pET-1209 кодирует белок (предположительно ацетилтрансферазу), соответствующую UniProt ID: **Q5SJ05** (с заменой Ala76Thr, что соответствует штаммовой вариабельности) с дополнительной С-концевой аминокислотной последовательностью His-tag (LENNNNNN).

Наработка в клетках E.coli и очистка рекомбинантного фермента TTHA1209. Клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали плазмидой pET-1209 при помощи метода электропорации с использованием 0.1 см кювет BioRad (BioRad Laboratories, Inc., США) и электропоратора ПЭП-2006 (ИБП РАН, Россия), и высевали на питательную среду LB с селективным антибиотиком канамицином 25 мкг/мл. Для наработки фермента в препаративных количествах, клетки нарабатывали в объеме 1 л среды 2YT с канамицином 25 мкг/мл. Когда культура достигала оптической плотности (OD_{600nm}) 0.8-1.0 ОЕ проводили индукцию синтеза белка путем добавления индуктора ИПТГ в концентрации 0.5 mM, и далее растили при температуре 37°C в течение 4 часов. Оптическую плотность культуры измеряли на приборе NanoPhotometer NP80 (IMPLEN, Германия). Биомассу осаждали при помощи центрифугирования при 5 тыс. g в течение 15 минут при температуре 4°C на центрифуге Beckman Coulter Avanti J-26XP (Beckman Coulter, США) и хранили при -70°C или же сразу использовали для выделения фермента.

Для очистки фермента ТТНА1209 использовали аффинную металл-хелатную хроматографию на Ni-NTA агарозе (QIAGEN) с использованием хроматографической системы низкого давления АКТА (GE Healthcare, США). Для выделения использовали буферы следующего состава: буфер А - 50 мМ натрий-фосфатный буфер pH=8.0, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазол; буфер В - 50 мМ натрий-фосфатный буфер pH=8.0, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол; С - 50 мМ натрий-фосфатный буфер pH=8.0, 300 мМ NaCl, 250 мМ имидазол. Биомассу клеток ресуспендировали в 40 мл буфера А, с добавлением ингибитора сериновых протеаз ПМСФ, ДНКазы и лизоцима. Клетки разрушали при помощи ультразвукового гомогенизатора Sonicator Q125 (Qsonica 125, США). Растворимую фракцию белков отделяли от клеточного дебриса при помощи центрифугирования при 10 тыс. g в течение 1 часа. Супернатант наносили на колонку с сорбентом Ni-NTA (5 мл), промывали 5 объемами буфера А, затем 5 объемами буфера В, белок элюировали буфером С. Анализ индукции и белковый состав хроматографических фракций анализировали при помощи электрофореза в 15% ПААГ в трис-глициновом буфере с использованием электрофоретического оборудования (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). ПААГ сканировали при помощи системы гель-документирования Pharos FX Plus (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Фракции, содержащие целевой белок, диализовали от имидазола против буфера 20 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, pH 8.5, 50% глицерин и хранили при -20°C. Концентрацию белка ТТНА1209 измеряли спектрофотометрически с использованием аналитический спектрофотометра Cary 100 (Agilent Technologies, США). Концентрацию высчитывали с учетом молекулярной массы 20672 Да и молярного коэффициента экстинкции белка $54480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, рассчитанных на основе аминокислотной последовательности согласно [24] и при помощи программы ProtParam <https://www.protparam.net/index.html>.

In vitro ацетилирование рекомбинантного альфа-парвальбумина крысы ферментом ТТНА1209. Для проверки N-ацетилтрансферазной активности рекомбинантного фермента ТТНА1209 проводили *in vitro* ацетилирование рекомбинантного альфа-парвальбумина крысы (ПА), наработанного в клетках *E.coli* и очищенного согласно методике опубликованной ранее [28]. Реакцию проводили в течение 16 часов при 37°C в 50 мкл реакционной смеси следующего состава: 5 мМ HEPES pH 8.1, 20-25 мкМ ПА, 2.5 мкМ ТТНА1209, 100 мкМ Ас-CoA, 1 мМ ЭДТА (для поддержания ПА в апо-форме). После реакции образцы подвергали диализу в дистиллирован-

ной воде и оценивали уровень N-концевого ацетилирования при помощи метода масс-спектрометрии. В качестве отрицательного контроля использовали ПА, не подвергавшийся реакции ацетилирования.

Анализ уровня ацетилирования ПА проводили на масс-спектрометрическом детекторе с электрораспылительной ионизацией (ESI-MS) Shimadzu Corporation, LCMS-2010EV (Shimadzu Co., Япония). Образцы 0,1–0,5 мкМ ПА в смеси деионизированной воды и ацетонитрила (10 мМ муравьиной кислоты) в соотношении 40:60 (по объему) вводили непосредственно со скоростью 40 мкл/мин в масс-детектор LCMS-2010EV. МС-спектры снимали в положительном режиме от 500 до 1500 м/з при скорости сканирования 125 а.е.м./с, напряжении детектора 1,5 кВ и расходе распыляющего азота 1,2 л/мин. Калибровку прибора проводили с использованием миоглобина сердца лошади (Sigma-Aldrich Co., США). Молекулярные массы белковых фракций анализировали при помощи программного обеспечения GPMW 9.02 [27].

Результаты исследования и их обсуждение

По данным базы NCBI ген *TTHA1209* аннотирован в геноме бактерии *T. thermophilus* как «probable acetyltransferase». В наших предыдущих исследованиях мы предположили, что *TTHA1209* кодирует фермент, который можно отнести к N-концевым ацетилтрансферазам (NAT), осуществляющих перенос ацетильной группы на N α -аминогруппу субстратов (N α -ацетилирование).

NAT бактерий имеют размеры от 140 до 205 аминокислот, и их молекулярная масса значительно меньше эукариотических ортологов. NAT бактерий характеризуются наличием в своей структуре единственного GNAT-домена, присутствием Р-петли в области между β 4 складкой и α 3 спиралью, а также наличием консервативного (для NAT бактерий) аспарагин (Asn) в начале спирали α 3. Так, например, наиболее изученные на сегодняшний день NAT RimI, RimJ и RimL бактерии *E.coli* состоят из 148 а.о., 194 а.о. и 174 а.о., соответственно [14; 38]. Анализ аминокислотной последовательности ТТНА1209 и множественное выравнивание с NAT из *E.coli* показал, что 175 а.о. фермент ТТНА1209 проявляет 27 %, 13 % и 16 % идентичности с ферментами RimI, RimJ и RimL, соответственно (Рис.1). Наибольший процент идентичности (27 %) ТТНА1209 наблюдается с ферментом RimI, что считается достаточно высокой для ферментов данного типа. Идентичность самих RimI, RimJ и RimL составляет от 19 до 23 % [23].

Фермент имеет V-образный активный центр, образованный параллельными $\beta 4$ - $\beta 5$ складками. В области между $\beta 4$ складкой и $\alpha 3$ спиралью располагается Р-петля (последовательность Q-R-K-G-L-G), а в начале

спирали $\alpha 3$ располагается консервативный (для NAT бактерий) аспарагин (Asn). В совокупности все это позволяет отнести ТТНА1209 к NAT. С использованием кристаллической структуры ТТНА1209 (PDB: 2CY2) и сервера PDBsum мы провели анализ топологии элементов вторичных структур. Анализ показал, что топология ТТНА1209 имеет вид $\beta 1-\alpha 1-\alpha 2-\beta 2-\beta 3-\beta 4-\alpha 3-\beta 5-\alpha 4-\beta 6-\beta 7$ (Рис. 2Б), характерный для NAT, однако область спиралей $\alpha 1-\alpha 2$ у ТТНА1209 несколько длинней, чем у ортологов *E.coli*. К сожалению, в настоящее время в литературе отсутствуют критерии для предсказания специфичности NAT на основе молекулярных структур, поэтому оценить роль этой дополнительной вставки в ферменте ТТНА1209 пока сложно.

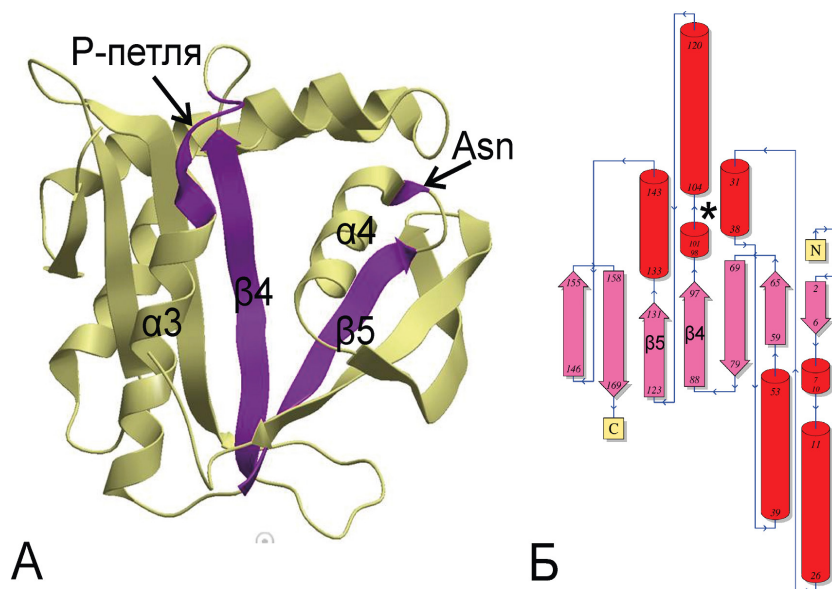


Рис. 2. А - ленточная диаграмма третичной структуры фермента ТТНА1209 (PDB: 2CY2). Отмечены основные элементы вторичных структур: фиолетовым отмечен V-образный активный центр, образованный параллельными $\beta 4$ - $\beta 5$ складками; область Р-петли и аспарагина (Asn) отмечены стрелками; Б – топология элементов вторичных структур фермента ТТНА1209, рассчитанная на основе 3D кристаллической структуры PDB: 2CY2 при помощи сервера <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>. Красными цилиндрами отмечены позиции α -спиралей, розовыми стрелками отмечены β -складки. Желтые квадраты с символами N и C указывают на N- и C- конец белка, соответственно. Звездочкой отмечено положение Р – петли.

В целом, фермент ТТНА1209 проявляет структурные особенности, характерные для NAT, однако схожую укладку имеют также ферменты полиамин-ацетилтрансферазы (ПАТ), лизин-ацетилтрансферазы (КАТ) и др. АТ, имеющие в своей структуре единичный GNAT-домен. Учитывая широкий спектр ацетилируемых субстратов NAT, их низкий процент идентичности и отсутствие четких критериев для предсказания их субстратной специфичности, актуальным представляется экспериментальная проверка активности ТТНА1209. Для проверки активности ТТНА1209 как предполагаемой NAT, ее ген был клонирован, а рекомбинантный фермент наработан в *E.coli*.

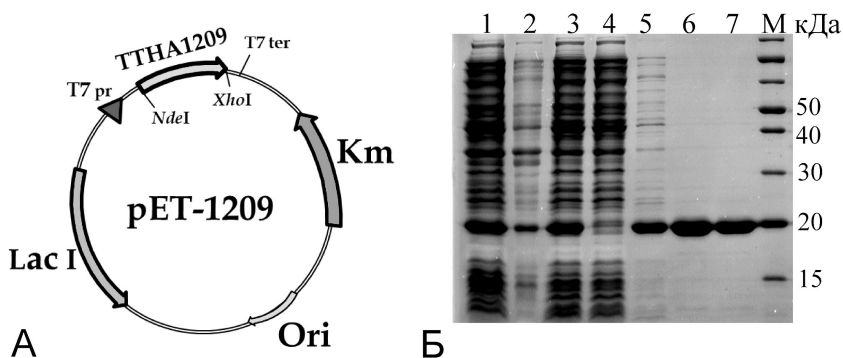


Рис. 3. Экспрессия и очистка рекомбинантного фермента ТТНА1209: А - Схема плазмидной конструкции рЕТ-1209, показывающая область ТТНА1209 (серая стрелка), промотор РНК-полимеразы Т7 (темно-серый треугольник) и другие области (серые стрелки), включая ColE1 ориджин репликации (Ori), ген репрессора LacI (LacI) и ген устойчивости к канамицину (Km). Стрелки указывают направление транскрипции. Показаны сайты рестрикции NdeI/XhoI, использованные для клонирования гена ТТНА1209; Б - Экспрессия в штамме *E. coli* BL21(DE3) и очистка ТТНА1209, отслеживаемая при помощи электрофореза в 15% ПААГ в денатурирующих условиях (окраска Кумаси бриллиантовым синим R-250). Дорожка 1 - растворимый экстракт клеток после 4 часов индукции; 2- осадок клеточного дебриса после разрушения биомассы клеток; 3 – растворимая фракция белков перед хроматографией; 4 – проскок через Ni-NTA; 5 – промывка буфером В; 6-7 – фракции элюции, содержащие белок ТТНА1209; М - маркеры молекулярной массы в кДа.

Выделение и очистка предполагаемой N-ацетилтрансферазы ТТНА1209. Рекомбинантный фермент ТТНА1209 был наработан в клетках *E.coli* BL21(DE3), содержащих плазмиду рЕТ-1209 (Рис. 3А), в виде растворимого белка, слитого с шестью остатками гистидина на С-конце белка, и очищен при помощи аффинной металл-хелатной хроматографии.

Этапы очистки представлены на рисунке 3Б). Как видно из рисунка нарабатываемый белок имеет чистоту свыше 95%, а его электрофоретическая подвижность соответствует расчетной массе ~ 20 кДа. Выход фермента составляет примерно 30 мг с 1 Л культуры.

Проверка N-ацетилтрансферазной активности ТТНА1209. Ранее нами было показано, что рекомбинантный парвальбумин крысы (ПА) является удобным модельным объектом для тестирования у ферментов ацетилтрансферазной активности и была исследована активность NAT из *E.coli* [17]. По данным базы UniProt, для ПА, как и многих белков эукариот, характерно наличие такой пост-трансляционной модификации как N-концевое (Nα-) ацетилирование (https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02625/entry#ptm_processing). Для проверки ацетилтрансферазной активности фермента ТТНА1209 мы использовали апо-форму ПА, поскольку она не обладает жесткой третичной структурой, что способствует ацетилированию. Поскольку в настоящее время отсутствуют данные о термостабильности и оптимуме работы фермента ТТНА1209, то реакцию проводили при температуре 37 °C. В результате масс-спектрометрического анализа образцов было установлено, что 10 % препарата ПА имеет массу 11924 Да, что соответствует фракции белка с N-концевым инициаторным метионином (iMet). Видимо, при наработке белка в клетках *E.coli* метионин аминокептидаза не полностью удалила инициаторный метионин (iMet). 24% препарата имеет массу 11793, что соответствует ПА без iMet, и дополнительных модификаций. По сравнению с контрольным образцом ПА (не обработанного ферментом), 45% препарата имеет массу 11834 Да (+41 Да), что соответствует ПА с одной ацетильной группой. Что свидетельствует о наличии у фермента ТТНА1209 Nα- ацетилтрансферазной активности. Хочется отметить, что 5 % препарата имеет массу 11875 Да (+82 Да), что может соответствовать ПА с двумя ацетильными группами. Возможно, фермент ТТНА1209, как RimI из *E.coli*, обладает Nε-ацетилтрансферазной активностью и является лизин ацетилтрансферазой (КАТ). В настоящее время в литературе отсутствуют данные об ацетилировании лизинов ПА. Для проверки КАТ активности фермента требуются дополнительные исследования.

Заключение

Исследование субстратной специфичности АТ является ключевым этапом их классификации. В настоящей работе впервые продемонстрирована характерная для NAT специфическая активность у фермента ТТНА1209,

который до выполнения данного исследования был аннотирован в геноме *T. thermophilus* как «probable acetyltransferase». Нами была клонирована ОРС и разработана методика очистки рекомбинантного фермента. Результаты анализа реакции *in vitro* ацетилирования ПА, полученные при помощи метода масс-спектрометрии, свидетельствуют о наличии у фермента ТТНА1209 α -ацетилтрансферазной активности. Вопрос в отношении наличия у фермента ТТНА1209 КАТ активности остается открытыми и требует дальнейшего изучения. Полученные данные расширяют наши представления о структурных особенностях NAT бактерий, их субстратной специфичности, и вносят вклад в понимание механизмов функционирования NAT и молекулярных основ их субстратной специфичности. Полученные результаты создают предпосылки для дальнейшего исследования субстратной специфичности и биохимических свойств новой NAT ТТНА1209 бактерии *Thermus thermophilus*, что откроет перспективы его использования в биотехнологии для ацетилирования белков и пептидов.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информация о спонсорстве. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00478, <https://rscf.ru/project/23-24-00478/>.

Список литературы / References

1. Bernal-Perez, L. F., & Ryu, Y. (2015). RimJ-Catalyzed Sequence-Specific Protein N-Terminal Acetylation in *Escherichia coli*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6, 12. <https://doi.org/10.4236/abb.2015.63018>
2. Bernal-Perez, L. F., Sahyouni, F., Prokai, L., & Ryu, Y. (2012). RimJ-mediated context-dependent N-terminal acetylation of the recombinant Z-domain protein in *Escherichia coli*. *Mol Biosyst*, 8, 1128-1130. <https://doi.org/10.1039/c2mb05499j>
3. Bienvenut, W. V., Giglione, C., & Meinel, T. (2015). Proteome-wide analysis of the amino terminal status of *Escherichia coli* proteins at the steady-state and upon deformylation inhibition. *Proteomics*, 15, 2503-2518. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500027>
4. Burckhardt, R. M., & Escalante-Semerena, J. C. (2020). Small-Molecule Acetylation by GCN5-Related N-Acetyltransferases in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 84. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00090-19> EDN: <https://elibrary.ru/ATYYYYZ>

5. Chen, W., Biswas, T., Porter, V. R., Tsodikov, O. V., & Garneau-Tsodikova, S. (2011). Unusual regioversatility of acetyltransferase Eis, a cause of drug resistance in XDR-TB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 9804-9808. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105379108>
6. Christensen, D. G., Meyer, J. G., Baumgartner, J. T., D'Souza, A. K., Nelson, W. C., Payne, S. H., Kuhn, M. L., Schilling, B., & Wolfe, A. J. (2018). Identification of Novel Protein Lysine Acetyltransferases in *Escherichia coli*. *mBio*, 9. <https://doi.org/10.1128/mBio.01905-18>
7. Collars, O. A., Jones, B. S., Hu, D. D., Weaver, S. D., Sherman, T. A., Champion, M. M., & Champion, P. A. (2023). An N-acetyltransferase required for ESAT-6 N-terminal acetylation and virulence in *Mycobacterium marinum*. *mBio*, 14, e0098723. <https://doi.org/10.1128/mbio.00987-23> EDN: <https://elibrary.ru/TZOYBZ>
8. D'Accolti, M., Bellotti, D., Dzien, E., Leonetti, C., Leveraro, S., Albanese, V., Marzola, E., Guerrini, R., Caselli, E., Rowinska-Zyrek, M., & Remelli, M. (2023). Impact of C- and N-terminal protection on the stability, metal chelation and antimicrobial properties of calcitermin. *Sci Rep*, 13, 18228. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45437-0> EDN: <https://elibrary.ru/MTBIVO>
9. Dash, A., & Modak, R. (2021). Protein Acetyltransferases Mediate Bacterial Adaptation to a Diverse Environment. *J Bacteriol*, 203, e0023121. <https://doi.org/10.1128/JB.00231-21> EDN: <https://elibrary.ru/DSNGDE>
10. Deng, S., & Marmorstein, R. (2021). Protein N-Terminal Acetylation: Structural Basis, Mechanism, Versatility, and Regulation. *Trends Biochem Sci*, 46, 15-27. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.08.005> EDN: <https://elibrary.ru/HVAAQD>
11. Esipov, R. S., Makarov, D. A., Stepanenko, V. N., & Miroshnikov, A. I. (2016). Development of the intein-mediated method for production of recombinant thymosin beta4 from the acetylated in vivo fusion protein. *J Biotechnol*, 228, 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.021> EDN: <https://elibrary.ru/WWJBLJ>
12. Favrot, L., Blanchard, J. S., & Vergnolle, O. (2016). Bacterial GCN5-Related N-Acetyltransferases: From Resistance to Regulation. *Biochemistry*, 23, 989-1002. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01269> EDN: <https://elibrary.ru/WVMSQP>
13. Huang, E., & Yousef, A. E. (2015). Biosynthesis of paenibacillin, a lantibiotic with N-terminal acetylation, by *Paenibacillus polymyxa*. *Microbiol Res*, 181, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.08.001> EDN: <https://elibrary.ru/YECKUW>
14. Isono, K., & Isono, S. (1980). Ribosomal protein modification in *Escherichia coli*. II. Studies of a mutant lacking the N-terminal acetylation of protein S18.

- Mol. Gen. Genet*, 177, 645-651. <https://doi.org/10.1007/bf00272675> EDN: <https://elibrary.ru/IFVGVY>
15. Kazakov, T., Kuznedelov, K., Semenova, E., Mukhamedyarov, D., Datsenko, K. A., Metlitskaya, A., Vondenhoff, G. H., Tikhonov, A., Agarwal, V., Nair, S., Van Aerschot, A., & Severinov, K. (2014). The RimL transacetylase provides resistance to translation inhibitor microcin C. *J Bacteriology*, 196, 3377-3385. <https://doi.org/10.1128/JB.01584-14> EDN: <https://elibrary.ru/UEYGGQT>
 16. Kudryashov, T. A., Trunilina, M. V., Bykov, V. V., Boldaevsky, I. S., Sokolov, A. S., & Lapteva, Y. S. (2023). Development of an algorithm for N-terminal acetyltransferases identification and verification of their functional activity. *JOURNAL BIOMED*, 19, 43-46. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3> EDN: <https://elibrary.ru/BJNZTF>
 17. Lapteva, Y. S., Vologzhannikova, A. A., Sokolov, A. S., Ismailov, R. G., Uversky, V. N., & Permyakov, S. E. (2021). In Vitro N-Terminal Acetylation of Bacterially Expressed Parvalbumins by N-Terminal Acetyltransferases from Escherichia coli. *Appl Biochem Biotechnol*. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03324-8> EDN: <https://elibrary.ru/CZOUNS>
 18. Le, V. T. B., Tsimbalyuk, S., Lim, E. Q., Solis, A., Gawat, D., Boeck, P., Lim, E. Q., Renolo, R., Forwood, J. K., & Kuhn, M. L. (2021). The Vibrio cholerae SpeG Spermidine/Spermine N-Acetyltransferase Allosteric Loop and beta6-beta7 Structural Elements Are Critical for Kinetic Activity. *Front Mol Biosci*, 8, 645768. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.645768> EDN: <https://elibrary.ru/HFGLJF>
 19. Lee, K., & Back, K. (2023). Escherichia coli RimI Encodes Serotonin N-Acetyltransferase Activity and Its Overexpression Leads to Enhanced Growth and Melatonin Biosynthesis. *Biomolecules*, 13, 908. <https://doi.org/10.3390/biom13060908> EDN: <https://elibrary.ru/KUBTTZ>
 20. Li, D., Yang, Y., Li, R., Huang, L., Wang, Z., Deng, Q., & Dong, S. (2021). N-terminal acetylation of antimicrobial peptide L163 improves its stability against protease degradation. *J Pept Sci*, 27, e3337. <https://doi.org/10.1002/psc.3337> EDN: <https://elibrary.ru/HPPSFL>
 21. Miao, L., Fang, H., Li, Y., & Chen, H. (2007). Studies of the in vitro Nalpha-acetyltransferase activities of E. coli RimL protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 357, 641-647. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.171>
 22. Miasaki, K. M. F., Wilke, N., Neto, J. R., & Alvares, D. S. (2020). N-terminal acetylation of a mastoparan-like peptide enhances PE/PG segregation in model membranes. *Chem Phys Lipids*, 232, 104975. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.104975> EDN: <https://elibrary.ru/TSXNWP>

23. Nesterchuk, M. V., Sergiev, P. V., & Dontsova, O. A. (2011). Posttranslational Modifications of Ribosomal Proteins in *Escherichia coli*. *Acta Naturae*, 3, 22-33. <https://doi.org/10.32607/20758251-2011-3-2-22-33> EDN: <https://elibrary.ru/OXKWAZ>
24. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.*, 4, 2411-2423. <https://doi.org/10.1002/pro.5560041120> EDN: <https://elibrary.ru/XZNIPR>
25. Pal, M., Yadav, V. K., Pal, P., Agarwal, N., & Rao, A. (2023). The physiological effect of rimI/rimJ silencing by CRISPR interference in *Mycobacterium smegmatis* mc(2)155. *Arch Microbiol*, 205, 211. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03561-5> EDN: <https://elibrary.ru/WNBFRF>
26. Pathak, D., Bhat, A. H., Sapehia, V., Rai, J., & Rao, A. (2016). Biochemical evidence for relaxed substrate specificity of Na-acetyltransferase (Rv3420c/rimI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific reports*, 6, 12.
27. Peri, S., Steen, H., & Pandey, A. (2001). GPMW-a software tool for analyzing proteins and peptides. *Trends Biochem Sci*, 26, 687-689. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01954-5](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01954-5) EDN: <https://elibrary.ru/AQGWYS>
28. Permyakov, S. E., Vologzhannikova, A. A., Emelyanenko, V. I., Knyazeva, E. L., Kazakov, A. S., Lapteva, Y. S., Permyakova, M. E., Zhadan, A. P., & Permyakov, E. A. (2012). The impact of alpha-N-acetylation on structural and functional status of parvalbumin. *Cell Calcium*, 52, 366-376. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.06.002> EDN: <https://elibrary.ru/SOHVBX>
29. Pletnev, P. I., Shulenina, O., Evfratov, S., Treshin, V., Subach, M. F., Serebryakova, M. V., Osterman, I. A., Paleskava, A., Bogdanov, A. A., Dontsova, O. A., Konevega, A. L., & Sergiev, P. V. (2022). Ribosomal protein S18 acetyltransferase RimI is responsible for the acetylation of elongation factor Tu. *J Biol Chem*, 298, 101914. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101914> EDN: <https://elibrary.ru/PJSPCV>
30. Ren, Y., Yao, X., Dai, H., Li, S., Fang, H., Chen, H., & Zhou, C. (2011). Production of Na-acetylated thymosin α1 in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 10, 2-8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-26> EDN: <https://elibrary.ru/ONECBZ>
31. Roy-Chaudhuri, B., Kirthi, N., Kelley, T., & Culver, G. M. (2008). Suppression of a cold-sensitive mutation in ribosomal protein S5 reveals a role for RimJ in ribosome biogenesis. *Mol Microbiol*, 68, 1547-1559. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06252.x>
32. Schmidt, A., Kochanowski, K., Vedelaar, S., Ahrne, E., Volkmer, B., Callipo, L., Knoops, K., Bauer, M., Aebersold, R., & Heinemann, M. (2016). The quantitative

- and condition-dependent *Escherichia coli* proteome. *Nat Biotechnol*, 34, 104-110. <https://doi.org/10.1038/nbt.3418> EDN: <https://elibrary.ru/BUYYYEB>
33. Vetting, M. W., Bareich, D. C., Yu, M., & Blanchard, J. S. (2008). Crystal structure of RimI from *Salmonella typhimurium* LT2, the GNAT responsible for N(alpha)-acetylation of ribosomal protein S18. *Protein Sci*, 17, 1781-1790. <https://doi.org/10.1110/ps.035899.108>
34. Vetting, M. W., Carvalho, L. P. S., Roderick, S. L., & Blanchard, J. S. (2005). A Novel Dimeric Structure of the RimL N α -acetyltransferase from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, 280, 22108-22114. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502401200> EDN: <https://elibrary.ru/MINOZH>
35. Vetting, M. W., Carvalho, L. P. S., Yu, M., Hegde, S. S., Magnet, S., Roderick, S. L., & Blanchard, J. S. (2005). Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433, 212-226. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.003>
36. White-Ziegler, C. A., Black, A. M., Eliades, S. H., Young, S., & Porter, K. (2002). The N-acetyltransferase RimJ responds to environmental stimuli to repress pap fimbrial transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 184, 4334-4342. <https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4334-4342.2002>
37. White-Ziegler, C. A., & Low, D. A. (1992). Thermoregulation of the pap operon: evidence for the involvement of RimJ, the N-terminal acetylase of ribosomal protein S5. *J Bacteriol*, 174, 7003-7012. <https://doi.org/10.1128/jb.174.21.7003-7012.1992>
38. Yoshikawa, A., Isono, S., Sheback, A., & Isono, K. (1987). Cloning and nucleotide sequencing of the genes rimI and rimJ which encode enzymes acetylating ribosomal proteins S18 and S5 of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.*, 209, 481-488. <https://doi.org/10.1007/BF00331153> EDN: <https://elibrary.ru/SZGZVG>

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку статьи для публикации.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The authors contributed equally to this article.

ДАнные ОБ АВТОРАХ

Кудряшов Тимофей Андреевич, младший научный сотрудник Лаборатории новых методов в биологии

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр
биологических исследований» Российской академии наук, Институт
биологического приборостроения с опытным производством РАН
пр-т Науки, 3, г. Пушино, Московская область, 142290, Российская
Федерация
kudryashovtim@gmail.com*

Локтюшов Евгений Владимирович, научный сотрудник Лаборатории
новых методов в биологии

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Фе-
деральный исследовательский центр «Пушинский научный центр
биологических исследований» Российской академии наук, Институт
биологического приборостроения с опытным производством РАН
пр-т Науки, 3, г. Пушино, Московская область, 142290, Российская
Федерация
zhenyaloktushov@gmail.com*

Трунилина Мария Викторовна, инженер-биотехнолог Лаборатории но-
вых методов в биологии

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Фе-
деральный исследовательский центр «Пушинский научный центр
биологических исследований» Российской академии наук, Институт
биологического приборостроения с опытным производством РАН
пр-т Науки, 3, г. Пушино, Московская область, 142290, Российская
Федерация
masha.trunilina@mail.ru*

Быков Вячеслав Владимирович, техник Лаборатории новых методов
в биологии

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный
центр биологических исследований» Российской академии наук,
Институт биологического приборостроения с опытным произ-
водством РАН
пр-т Науки, 3, г. Пушино, Московская область, 142290, Российская
Федерация
naggilan88@gmail.com*

Соколов Андрей Сергеевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Лаборатории новых методов в биологии
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований» Российской академии наук, Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН пр-т Науки, 3, г. Пушкино, Московская область, 142290, Российская Федерация
212sok@gmail.com

Лаптева Юлия Сергеевна, кандидат биологических наук, доцент ФИЦ ПНЦБИ РАН, старший научный сотрудник Лаборатории новых методов в биологии
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований» Российской академии наук, Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН пр-т Науки, 3, г. Пушкино, Московская область, 142290, Российская Федерация
yulia.s.lapteva@gmail.com

DATA ABOUT THE AUTHORS

Timofey A. Kudryashov, Junior Researcher at the Laboratory of New Methods in Biology
Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Institute for Biological Instrumentation
3, Nauki Ave., Pushchino, Moscow region, 142290, Russian Federation
ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-2092-7028>
kudryashovtim@gmail.com

Eugene V. Loktyushov, Research Fellow at the Laboratory of New Methods in Biology
Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Institute for Biological Instrumentation
3, Nauki Ave., Pushchino, Moscow region, 142290, Russian Federation
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2028-1789>
zhenyaloktushov@gmail.com

Maria V. Trunilina, Biotechnologist at the Laboratory of New Methods in Biology
Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Institute for Biological Instrumentation
3, Nauki Ave., Pushchino, Moscow region, 142290, Russian Federation
ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-9171-3083>
masha.trunilina@mail.ru

Vyacheslav V. Bykov, Technician at the Laboratory of New Methods in Biology
Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Institute for Biological Instrumentation
3, Nauki Ave., Pushchino, Moscow region, 142290, Russian Federation
ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-3978-7862>
naggilan88@gmail.com

Andrey S. Sokolov, Cand. of Bio. Sc., Senior Research at the Laboratory of New Methods in Biology
Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Institute for Biological Instrumentation
3, Nauki Ave., Pushchino, Moscow region, 142290, Russian Federation
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7145-251X>
212sok@gmail.com

Yulia S. Lapteva, Cand. of Bio. Sc., Assistant professor, Senior Research at the Laboratory of New Methods in Biology
Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Institute for Biological Instrumentation
3, Nauki Ave., Pushchino, Moscow region, 142290, Russian Federation
SPIN-code: 9441-3917
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6607-9861>
ResearcherID: D-7227-2012
Scopus Author ID: 55257828600
yulia.s.lapteva@gmail.com

Поступила 26.07.2024

После рецензирования 05.09.2024

Принята 28.09.2024

Received 26.07.2024

Revised 05.09.2024

Accepted 28.09.2024