ETH zürich

ETH Library

Exploring Extracellular Peptidases in Wastewater Systems and their Potential to Hydrolyze Peptide-Based Chemicals

Doctoral Thesis

Author(s):
Wichmann, Natalie

Publication date:
2025

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-b-000732298

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

DISS. ETH NO. 30771

Exploring Extracellular Peptidases in Wastewater Systems and their Potential to Hydrolyze Peptide-Based Chemicals

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Natalie Wichmann
MSc in Nanosciences, University of Basel
born on 23.11.1996

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Martin Ackermann
Prof. Dr. Michael Zumstein
Dr. Elisabeth Janssen
Prof. Dr. Carol Arnosti
Prof. Dr. Thomas Böttcher

2025

Summary

Peptide-based chemicals are increasingly used due to their versatility and efficacy - for example as components of pharmaceuticals and home and personal care products. Following their use, a large fraction of applied and administered chemicals are released into wastewater systems. An incomplete removal of chemicals during the wastewater treatment process leads to their release into natural environments, where they can negatively affect ecosystems. The presence of chemicals in wastewater treatment systems and natural systems can have adverse effects on water quality, aquatic life, ecosystem functions, and public health. The presence of bioactive chemicals poses additional risks such as the emergence of antibiotic resistance or endocrine disruption. Therefore, rapid biotransformation and inactivation of chemicals in wastewater systems may be beneficial. Previous studies revealed that wastewater systems harbor an array of active peptidases for the extracellular hydrolysis of proteins into peptides that are sufficiently small to be taken up and metabolized by microorganisms. These extracellular peptidases may hold the potential to hydrolyze anthropogenic peptide-based chemicals. To assess this potential, it is crucial to investigate (i) extracellular peptidase activities at different stages along the wastewater treatment process, (ii) specificities of the prevalent extracellular peptidases across different wastewater treatment plants (WWTPs) to understand which structural features of peptide bonds enhance their hydrolysability by peptidases, and (iii) identities and origins of prevalent extracellular peptidases in wastewater systems. Therefore, the goal of this thesis was to gain a comprehensive understanding of the activity, specificity, and identity of extracellular peptidases in wastewater systems and to shine light on their potential to hydrolyze anthropogenic peptide-based chemicals in wastewater.

In the first part of the thesis, we analyzed extracellular peptidase activities across different stages of the wastewater treatment process using an activity assay based on the enzymatic conversion of fluorogenic casein. We observed higher extracellular peptidase activities in influent samples compared to aeration tank samples and found that this trend was conserved across the four tested full-scale WWTPs, as well as across different sampling dates. Using active influent extracts, we assessed the potential of the prevalent peptidases to biotransform a chemically diverse set of ten antimicrobial peptides (AMPs), which are considered promising alternatives to conventional small-molecule antibiotics due to their limited tendency to evoke antibiotic resistance. The observed kinetics of AMP biotransformation varied across the different AMPs; however, trends across different WWTPs were conserved. While these findings imply that the environmental fate of different AMPs needs to be evaluated individually, our study highlighted that some of the tested AMPs were readily hydrolyzed in wastewater - thereby potentially reducing the release of active antimicrobial agents

into the environment. Analyzing transformation products of rapidly hydrolyzed AMPs revealed a distinct set of products that was formed in all tested extracts from different WWTPs. This indicated that extracellular peptidase specificities are - to a certain extent - conserved across different WWTPs. Implications of a rapid hydrolysis of AMPs on microbial community composition and resistance emergence in wastewater systems remains to be investigated.

In the second part of the thesis, we investigated the specificity of extracellular peptidases in wastewater systems using multiplex substrate profiling by mass spectrometry (MSP-MS). MSP-MS is based on a systematically designed model peptide library covering a wide range of possible amino acid combinations. Identification of hydrolysis products using high-resolution mass spectrometry allows for the generation of specificity profiles that reveal which peptide bonds are favorably hydrolyzed by the peptidases in a sample of interest. We consistently found that hydrolysis by extracellular wastewater peptidases was favored when positively charged amino acids (i.e., arginine and lysine) are next to the cleavage site and disfavored by negatively charged amino acids (i.e., aspartic- and glutamic acid) in close proximity. Experiments with WWTP influent and aeration tank samples showed distinct specificity profiles that were largely conserved across the three tested full-scale WWTPs. The similarity between peptidase specificity profiles from influent and aeration tank samples implies that peptidases in aeration tanks might originate from the influent. To validate the most distinct specificities, we employed two fluorogenic peptidase substrates - one containing arginine and thus expected to be hydrolyzed rapidly and one containing aspartic acid and thus expected to be hydrolyzed slowly. Together, the findings presented in this part of the thesis highlight the distinct specificities of extracellular peptidases in wastewater that could guide the design of peptide-based chemicals for rapid hydrolysis in wastewater systems.

In the third part of the thesis, we aimed to gain insights into the identities of extracellular peptidases in WWTP influent samples. Using peptidase class-specific inhibitors and activity assays, we found that serine peptidase inhibitors reduced peptidase activities in wastewater extracts to the largest extent – indicating the predominance of serine peptidases in influent samples. We tested different protein enrichment protocols and found that molecular weight cut-off filtration was most effective in enriching active peptidases in the samples and reducing the complexity of the sample. To identify peptidases, we first screened different activity-based probes specifically designed to target serine peptidases. Subsequent biotin/streptavidin enrichment and purification followed by high-resolution mass spectrometry-based proteome analysis revealed several peptidases. Among these were microbial and mammalian peptidases occurring in the human intestinal tract, as well as peptidases that are closely related to those used in laundry detergent formulations. These results

provided first insights into the identities and origins of extracellular peptidases in wastewater.

Combined, our findings provide an understanding for the activity, specificity and identity of extracellular peptidases present in wastewater systems. These insights enable predictions on the fate of peptide-based chemicals in wastewater and can guide the (re-)design of peptide-based chemicals for an enhanced biotransformation in wastewater.

Zusammenfassung

Peptid-basierte Chemikalien werden aufgrund ihrer Vielseitigkeit und Wirksamkeit zunehmend in Arzneimitteln sowie in Haushalts- und Körperpflegeprodukten verwendet. Nach ihrer Verwendung gelangen große Teile der benutzten Chemikalien ins Abwasser und anschliessend in Kläranlagen. Eine unvollständige Beseitigung solcher Chemikalien während des Klärprozesses kann zu deren Freisetzung in die Umwelt führen. Während bioaktive Verbindungen in Kläranlagen die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften beeinflussen können, führt die Freisetzung nicht-abbaubarer chemischer Verbindungen häufig zu deren Akkumulierung in der Umwelt. Dies kann sich nachteilig auf die Wasserqualität, aquatische Organismen und Ökosystemfunktionen auswirken und schließlich eine Gefahr für die öffentliche Gesundheit darstellen. Ein schneller Abbau chemischer Verbindungen im Abwasser kann daher vorteilhaft sein, um negative Auswirkungen auf die Umwelt zu verhindern. Frühere Studien haben gezeigt, dass Abwasser eine Reihe von Peptidasen für die extrazelluläre Hydrolyse von Proteinen in kleinere Peptide enthält. Sind diese Peptide klein genug, können sie von Mikroorganismen aufgenommen werden und als Nährstoffquelle dienen. Diese extrazellulären Peptidasen im Abwasser könnten ebenfalls in der Lage sein, anthropogene peptid-basierte Chemikalien zu hydrolysieren. Um dies zu evaluieren, bedarf es eines grundlegenden Verständnisses für (i) extrazelluläre Peptidaseaktivitäten an verschiedenen Stufen des Klärprozesses, (ii) Spezifitäten dieser Peptidasen in verschiedenen Kläranlagen, um den Einfluss von Strukturelementen in Peptidbindungen auf die Hydrolysierbarkeit der Peptide zu entschlüsseln, und (iii) Identität und Ursprung der extrazellulären Peptidasen im Abwasser. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Aktivität, Spezifität und Identität extrazellulärer Peptidasen in Abwassersystemen zu untersuchen, um ihr Potenzial zur Hydrolyse anthropogener peptid-basierter Chemikalien zu verstehen.

Im ersten Teil der Arbeit haben wir die Aktivitäten extrazellulärer Peptidasen in verschiedenen Stadien des Abwasserreinigungsprozesses mithilfe eines Aktivitätsassays basierend auf der Hydrolyse von fluorogenem Casein analysiert. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die extrazelluläre Peptidaseaktivität in Zulaufproben höher war als in Proben aus dem Belebungsbecken. Diese Tendenz konnten wir sowohl an verschiedenen Daten der Probennahme als auch in vier verschiedenen Kläranlagen beobachten. Um zu untersuchen, ob extrazelluläre Peptidasen im Abwasser in der Lage sind, relevante antimikrobielle Peptide (AMPs) abzubauen, haben wir die Peptidasen aus dem Zulauf mit einem Set chemisch vielfältiger AMPs inkubiert. Das Ausmaß der Biotransformation variierte zwischen den verschiedenen AMPs; Trends zwischen den verschiedenen Kläranlagen waren jedoch konserviert. Während diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass der Verbleib

der verschiedenen AMPs in der Umwelt individuell bewertet werden muss, zeigt unsere Studie, dass einige der getesteten AMPs schnell hydrolysiert wurden - wodurch die Freisetzung aktiver antimikrobieller Wirkstoffe in die Umwelt reduziert werden könnte. Die Analyse der Transformationsprodukte schnell hydrolysierter AMPs hat gezeigt, dass ein bestimmtes Set an Produkten in allen getesteten Extrakten der verschiedenen Kläranlagen gebildet wurde. Dies deutet darauf hin, dass extrazelluläre Peptidasen im Abwasser spezifisch sind und dass diese Spezifizität zu einem gewissen Ausmass über die getesteten Kläranlagen konserviert ist. Die Auswirkungen einer schnellen AMP Hydrolyse auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft im Abwasser, sowie auf die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen im Abwasser, bleiben zu untersuchen.

Im zweiten Teil der Arbeit untersuchten wir die Spezifität extrazellulärer Peptidasen in Abwassersystemen mittels Multiplex-Substratprofilanalyse durch Massenspektrometrie (MSP-MS). MSP-MS basiert auf einem systematisch entworfenen Set von Modellpeptiden, die ein breites Spektrum an möglichen Aminosäurekombinationen abdecken. Die Identifizierung der Transformationsprodukte mittels hochauflösender Massenspektrometrie ermöglicht die Erstellung von Spezifitätsprofilen, die zeigen, welche Peptidbindungen bevorzugt hydrolysiert werden. Wir haben die Spezifitätsprofile extrazellulärer Peptidasen aus Zulauf und Belebungsbecken von drei verschiedenen Kläranlagen verglichen. Für beide Systeme und in allen Kläranlagen haben wir gefunden, dass die Hydrolyse von Peptidbindungen durch positiv geladene Aminosäuren (d.h. Arginin und Lysin) in der Nähe der jeweiligen Peptidbindung begünstigt wurde, und durch negativ geladene Aminosäuren (d.h. Asparagin- und Glutaminsäure) benachteiligt wurde. Die Ähnlichkeit zwischen den Spezifitätsprofilen von Zulauf- und Belebungsbeckenproben deutet darauf hin, dass Peptidasen in den Belebungsbecken aus dem Zulauf stammen könnten. Um die markantesten Spezifitäten zu validieren, haben wir zwei fluorogene Peptidasesubstrate ausgewählt - ein Substrat mit Arginin (mit erwarteter hoher Hydrolyserate) und ein Substrat mit Asparaginsäure (mit erwarteter niedriger Hydrolyserate) - und Hydrolyseraten dieser Substrate in Abwasserextrakten bestimmt, was die beobachteten Spezifitäten bestätigte. Diese Ergebnisse zeigen die deutliche Spezifizität extrazellulärer Peptidasen im Abwasser, welche bei der Entwicklung peptid-basierter Chemikalien genutzt werden könnte, um die Abbaubarkeit dieser Chemikalien im Abwasser zu verbessern.

Im dritten Teil der Arbeit haben wir die Identität extrazellulärer Peptidasen in Zulaufproben untersucht. Dazu haben wir zuerst verschiedene Peptidaseklassen-spezifische Inhibitoren zu den Zulaufproben gegeben und Peptidaseaktivitäten bestimmt. Dies zeigte, dass Serinpeptidaseinhibitoren die Peptidaseaktivitäten extrazellulärer Abwasserpeptidasen aus dem Zulauf am stärksten verringerten - ein Hinweis darauf, dass Serin-Peptidasen in Abwasserproben in grosser Menge vorhanden sind.

Anschliessend haben wir verschiedene Ansätze getestet, um aktive Peptidasen in den Proben anzureichern. Filtration mit einem Molekulargewichtsausschluss war die effektivste Methode, um aktive Peptidasen anzureichern und gleichzeitig die Komplexität der Proben zu reduzieren. Um Peptidasen zu identifizieren, haben wir verschiedene aktivitätsbasierte Sonden verwendet, die selektiv an Serinpeptidasen binden. Anschliessende Anreicherung mittels Biotin-Streptavidin und Proteomanalyse basierend auf hochauflösender Massenspektrometrie führte zur Identifikation einiger Peptidasen. Darunter waren mikrobielle und Säugetierpeptidasen, die vorwiegend im Magen-Darm-Trakt von Menschen vorkommen, sowie Peptidasen mit hoher Verwandtschaft zu Peptidasen, die häufig in Waschmittelformulierungen zu finden sind. Diese Ergebnisse liefern erste Einblicke in Identität und Ursprung extrazellulärer Peptidasen im Abwasser.

Zusammengenommen liefern unsere Ergebnisse ein Verständnis für die Aktivität, Spezifität und Identität extrazellulärer Peptidasen in Abwassersystemen. Diese Erkenntnisse ermöglichen Vorhersagen über den Verbleib peptid-basierter Chemikalien im Abwasser und könnten die Entwicklung umweltfreundlicher Chemikalien für eine verbesserte Biotransformation im Abwasser leiten.