

Инжиниринг рекомбинантной декстраназы: создание мутантных форм фермента с увеличенной активностью в широком диапазоне температур

Научный руководитель – Волков Павел Валерьевич

Горинов Ярослав Денисович

Студент (бакалавр)

Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Институт новых материалов и нанотехнологий, Москва, Россия

E-mail: y4r9@yandex.ru

Опережая развитие методов структурного моделирования белков, растет потребность в алгоритмах, способных прогнозировать точечные аминокислотные замены, обеспечивающие требуемые функциональные свойства белка. В данной работе на примере рекомбинантной декстраназы (PsDex49, КФ 3.2.1.11), рассматривается возможность изменения каталитических свойств фермента при производстве различных аминокислотных замен. Актуальность работы в рамках исследуемого фермента также обусловлена потенциалом применения декстраназы в медицине, которое ограничено низкой активностью в физиологических условиях организма.

Осуществлены аминокислотные замены в конформационно-жестком фрагменте третичной структуры: D432N, T363A, D432E и I414A, основанные на гипотезе о взаимной корреляции диапазона термостабильности и температурным оптимумом активности фермента [5]. Основой для расчетов активности мутантных форм являлся описанный ранее механизм каталитической реакции [1, 2]. Первые три мутации были расположены в непосредственной близости от активного центра, тогда как четвертая модификация способствовала уменьшению гидрофобного взаимодействия между участками β -спирали, находящимися под каталитической щелью. Для оценки жесткости структуры амплитуды конформационных колебаний белковой молекулы определялись через анализ нормальных мод колебаний с использованием метода DynaMut Normal Mode Analysis [4]. Референсной моделью для расчетов служила структура декстраназы *P. minioluteum*, идентичная исследуемой на 98,95 % [2].

Эффективность аминокислотных замен проверялась с использованием мутантных форм фермента, экспрессированных в метанотрофном штамме *P. pastoris* (*Komagataella phaffii*) [3]. По результатам первичного скрининга КЖ для двух модификаций удалось получить значения удельной активности, значительно превышающие этот показатель у немутантной формы. Также измерение активности в КЖ показало сдвиг температурного максимума с 55 °С до 50 °С для всех модификаций. При этом сохранение остаточной активности в оптимальном диапазоне (30–40 °С) оказалось наибольшим для вариантов D432N и I414A (около 70 % от максимальной при 40 °С), тогда как у нативного фермента этот показатель снижается до 45 %. Сравнительный анализ изоформ показал, что термодинамически наиболее устойчивыми при 50 °С являются варианты D432N и T363D, демонстрирующие падение активности за 30 мин всего на 40 %, что хорошо согласуется с расширенным профилем их температурной активности. Изучение активности модифицированной декстраназы с заменой D432N при различных значениях pH показало заметное сужение pH-профиля и смещение максимума на 0,4 единицы в сторону более кислой области. Остальные мутантные формы проявили исследуемые свойства, близкие к исходным свойствам нативного фермента.

Предложенная стратегия расчёта аминокислотных замен может быть распространена и на другие ферменты, что позволит существенно расширить область их применения.

Исследование выполнено при поддержке Фонда Содействия Инновациям, заявка СтС-509389.

Источники и литература

- 1) Hu Xue-Qin, Xia Bing-Bing, Ru Wei-Juan, Zhang Yu-Xin, Yang Jing-Wen, Zhang Hong-Bin. Research progress on structure and catalytic mechanism of dextranase // eFood. — 2023. — Vol. 4, No. 1. — P. 1–17. — DOI: 10.1002/efd2.60.
- 2) Larsson A. M., Andersson R., Ståhlberg J., Kenne L., Jones T. Alwyn. Dextranase from *Penicillium minioluteum*: Reaction Course, Crystal Structure and Product Complex. // Structure. 2003; 11(9):1111-1121. DOI: 10.1016/S0969-2126(03)00147-3.
- 3) Looser V., Bruhlmann B., Bumbak F., Stenger C., Costa M., Camattari A., Fotiadis D., Kovar K. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. // Biotechnol. Adv., 2015, 33(6), part 2, 1177–1193, ISSN 0734-9750.
- 4) Rodrigues CH, Pires DE, Ascher DB. DynaMut: predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability // Nucleic Acids Research. — 2018 Apr 30;46(Web Server issue):W350-W355. DOI: 10.1093/nar/gky300.
- 5) Wei Zhen, Chen Jinling, Xu Linxiang, Liu Nannan, Yang Jie, Wang Shujun. Improving the thermostability of GH49 dextranase AoDex by site-directed mutagenesis // AMB Express. — 2023. — Vol. 13, Art. no. 7. — DOI: 10.1186/s13568-023-01513-2.

Иллюстрации

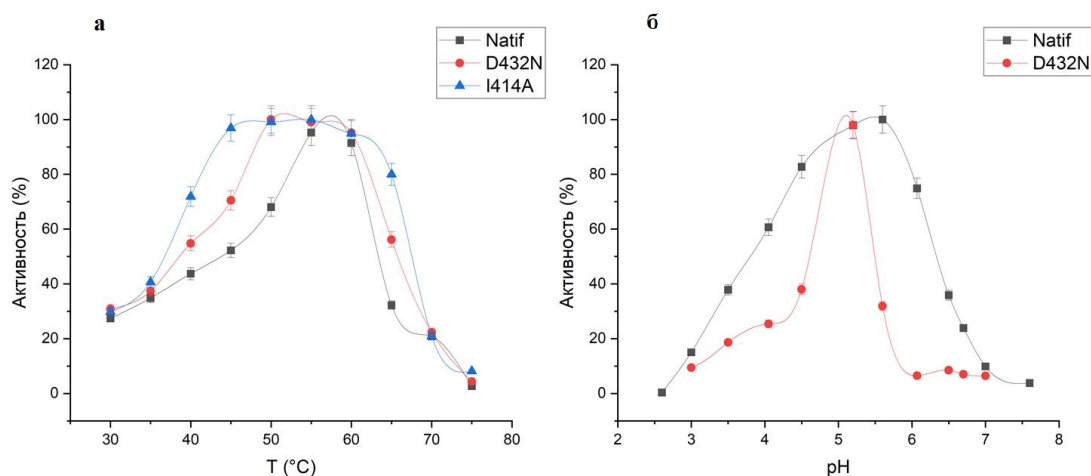


Рис. : Зависимости активности мутантных форм декстраназы, демонстрирующих явную динамику, от температуры (а) и рН среды (б) в сравнении с природным белком