

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-54

**ПОИСК И АНАЛИЗ МУТАНТНЫХ ФОРМ СУБТИЛИЗИНА E ИЗ *BACILLUS SUBTILIS*:
ОПТИМИЗАЦИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ЗАРЯД-ЗАРЯДОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ ТОЧКУ БЕЛКА**

**SEARCH AND ANALYSIS OF MUTANT FORMS OF SUBTILISIN E FROM *BACILLUS SUBTILIS*:
OPTIMIZATION OF SURFACE CHARGE-CHARGE INTERACTIONS AND THEIR EFFECT
ON THE ISOELECTRIC POINT OF THE PROTEIN**

А. А. Величко, Г. Д. Миловидов, М. П. Шевелёва, В. А. Немашкалов

Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пушкино

A.A. Velichko, G.D. Milovidov, M.P. Shevelyova, V.A. Nemashkalov

Institute for Biological Instrumentation RAS, Pushchino

✉ vaconf13@yandex.ru

Аннотация

Для субтилизина E из *Bacillus subtilis* был проведен *in silico* анализ мутантных форм, полученных путем оптимизации его заряд-зарядовых взаимодействий, и оценен эффект этих мутаций на изоэлектрическую точку белка. Остатки Glu61 и Asp166 были заменены на Lys, а остатки Lys71 и Lys343 — на Asp. Все замены, за исключением Lys71Asp, способствовали повышению стабильности молекулы. Изоэлектрическая точка белка зависела только от его суммарного заряда.

Abstract

For subtilisin E from *Bacillus subtilis* an *in silico* analysis of mutant forms, obtained by optimizing its charge-charge interactions, was carried out. The effect of these mutations on the isoelectric point was assessed. Residues Glu61 and Asp166 were replaced by Lys, Lys71 and Lys343 by Asp. All substitutions, with the exception of Lys71Asp, increased the stability of the molecule. The isoelectric point of a protein depended only on its total charge.

Субтилизин E, продуцируемый *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* и *Bacillus pumilus*, относится к классу сериновых протеаз [1]. Субтилизины — универсальные протеазы, они находят промышленное применение в производстве моющих и косметических средств, обработке шерсти и кожи, фармацевтической промышленности [2, 3]. Увеличение стабильности является одной из основных задач при работе с этими ферментами, поскольку это позволяет применять их при более высоких температурах, что повышает скорость катализируемых реакций. С другой стороны, изменения в изоэлектрической точке в процессе мутаций могут привести к уменьшению эффективности фермента. В данной работе был проведен *in silico* анализ мутантных форм субтилизина E из *Bacillus subtilis*, полученных путем оптимизации его поверхностных заряд-зарядовых взаимодействий, и оценено влияние этих мутаций на изоэлектрическую точку и стабильность белка.

Структура субтилизина E организма *Bacillus subtilis* (UniProt ID: P04189) была взята из Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), PDB ID: 3WHI. Вклад в изменение энергии Гиббса белка, обусловленный заряд-зарядовыми взаимодействиями, ΔG_{qq} , вычислялся с помощью программы TKSA-MC (*Tanford-Kirkwood Solvent Accessibility model with the Monte Carlo method*) (<https://github.com/contessoto/teksamc>) при pH 8,0 и 27 °C [4]. На дестабилизирующий вклад в структуру белка ионизированных аминокислотных остатков указывает значение $\Delta G_{qq} > 0$ и SASA > 50 % (*Solvent-Accessible Surface Area* — площадь поверхности остатка, доступная растворителю) [5]. Структуры мутантных форм белка были получены с помощью программы AlphaFold 2 (<https://www.alphafold.ebi.ac.uk>) [6]. Изоэлектрическая точка (pI) белка и его мутантов была рассчитана по их первичной последовательности с помощью веб-сервисов Protein Calculator (<https://protcalc.sourceforge.net/>), Compute pI/Mw (https://web.expasy.org/compute_pi/) и Protein Parameters (<https://www.protparam.net/index.html>) [7, 8]. Нумерация остатков приведена в соответствии с последовательностью UniProt.

Анализ профиля ΔG_{qq} субтилизина E показал, что аминокислотные заряженные поверхностные остатки Glu61, Lys71, Asp166 и Lys343 дестабилизируют белок. Для Glu61, Lys71 и Asp166 это обусловлено нахождением в плотном электростатическом окружении, а для Lys343 — электростатическим отталкиванием

от His344. Инверсия зарядов путем замены этих остатков, предположительно, приведет к увеличению стабильности белка. Для кислотных остатков была проведена замена на лизин, а для лизина — на аспарагиновую кислоту. Для каждой мутации была рассчитана изоэлектрическая точка и проведено сравнение ее с диким типом. Замены Glu61Lys, Asp166Lys и Lys343Asp привели к значительному повышению стабильности белка ($\Delta\Delta G_{\text{Glu61Lys}} = -12,71$ кДж/моль, $\Delta\Delta G_{\text{Asp166Lys}} = -3,27$ кДж/моль, $\Delta\Delta G_{\text{Lys343Asp}} = -8,61$ кДж/моль). Мутация Lys71Asp дестабилизировала молекулу ($\Delta\Delta G_{\text{Lys71Lys}} = 16,36$ кДж/моль). Сочетание мутаций значительно увеличило их эффект ($\Delta\Delta G_{\text{Asp61Lys+Asp166Lys}} = -4,36$ кДж/моль, $\Delta\Delta G_{\text{Asp61Lys+Asp343Lys}} = -24,29$ кДж/моль, $\Delta\Delta G_{\text{Asp166Lys+Asp343Lys}} = -20,45$ кДж/моль, $\Delta\Delta G_{\text{Asp61Lys+Asp166Lys+Asp343Lys}} = -33,66$ кДж/моль). Введение множественной мутации Asp61Lys + Asp166Lys + Asp343Lys привело к тому, что значимо увеличился дестабилизирующий эффект остатка Lys56 на структуру белка. Его замена на аспарагиновую кислоту приводила к повышению стабильности белка ($\Delta\Delta G = -40,69$ кДж/моль). Изменения в изоэлектрической точке белка зависели только от конечного суммарного заряда мутантного белка. Точечные замены отрицательно заряженных остатков на лизин изменяли pI с 8,74 до 9,04, а Lys71Asp — с 8,74 до 7,98. Мутации Glu61Lys + Lys343Asp, Asp166Lys + Lys343Asp и Lys56Asp + Glu61Lys + Asp166Lys + Lys343Asp не влияли на изоэлектрическую точку белка.

Таким образом, в данной работе был проведен анализ влияния заряженных аминокислотных остатков субтилизина E на изменение энергии Гиббса молекулы ΔG_{qq} . Были выбраны мутации, потенциально приводящие к повышению стабильности фермента, и оценено их влияние на изоэлектрическую точку белка. Значение изоэлектрической точки белка зависело только от его суммарного заряда. Наблюдаемый эффект может быть объяснен тем, что количество ионизируемых групп в белке является основным показателем значения изоэлектрической точки, выражающей электростатические свойства всей молекулы, в то время как изменения в заряд-зарядовых взаимодействиях сосредоточены в основном вокруг заменяемых остатков. Полученные результаты будут в дальнейшем использованы для дизайна мутантных форм повышенной стабильности субтилизина E.

Литература

1. Zolfaghari Emameh R., Kazokaité J., Yakhchali B. Bioinformatics analysis of extracellular subtilisin E from *Bacillus subtilis* // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2022. Vol. 40, № 16. P. 7183–7190.
2. Tang H. et al. Insight into subtilisin E-S7 cleavage pattern based on crystal structure and hydrolysates peptide analysis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. Vol. 512, № 3. P. 623–628.
3. Azrin N.A.M. et al. Versatility of subtilisin: A review on structure, characteristics, and applications // *Biotech. App. Biochem.* 2022. Vol. 69, № 6. P. 2599–2616.
4. Contessoto V.G. et al. TKSA-MC: A web server for rational mutation through the optimization of protein charge interactions // *Proteins.* 2018. Vol. 86, № 11. P. 1184–1188.
5. Loladze V.V. et al. Engineering a Thermostable Protein via Optimization of Charge-Charge Interactions on the Protein Surface // *Biochem.* 1999. Vol. 38, № 50. P. 16419–16423.
6. Mirdita M. et al. ColabFold: making protein folding accessible to all // *Nat. Methods.* 2022. Vol. 19, № 6. P. 679–682.
7. Bjellqvist B. et al. Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions // *Electrophoresis.* 1994. Vol. 15, № 1. P. 529–539.
8. Bjellqvist B. et al. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences // *Electrophoresis.* 1993. Vol. 14, № 1. P. 1023–1031.