

***In silico* поиск и анализ мутантных форм повышенной термостабильности промышленно значимого фермента савиназы из *Bacillus lentus* путем оптимизации его поверхностных заряд-зарядовых взаимодействий**

Величко А.А.*, Миловидов Г.Д., Дерюшева Е.И., Шевелёва М.П.,
Немашкалов В.А.

ФГБУН ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований» РАН, Институт биологического приборостроения, Пушкино, Московская область, Россия

* vaconf13@yandex.ru

Ключевые слова: савиназа; электростатические взаимодействия; термостабильность; TKSA-MC; AlphaFold

Мотивация и цель: Ферменты широко применяются в различных промышленных отраслях для обработки первичного сырья. По сравнению с традиционными химическими процессами биохимические подходы к осуществлению технологических процессов позволяют добиться большего выхода целевого продукта за счет высокой каталитической активности и специфичности ферментов, а также экономических и экологических преимуществ за счет более мягких условий, уменьшения объемов и токсичности отходов. Протеазы, вызывающие расщепление пептидной связи и гидролизующие белки до небольших пептидов и аминокислот, используются для обработки кожи и тканей, улучшения усвояемости кормов и качества пищи, при производстве моющих средств и биотоплива. Повышение их стабильности и активности в промышленных условиях их функционирования является одной из главных задач модификации этого класса белков. Фермент савиназа, секретируемая алкалафильной бактерией *Bacillus lentus*, относится к сериновым протеазам и в настоящее время широко используется в моющих средствах в качестве добавки для удаления белковых отложений. Её оптимальный рабочий диапазон температур 30–70 °С и pH 8–12. Белок связывает два иона кальция, которые наряду с семью солевыми мостиками между ионизированными аминокислотными остатками способствуют стабилизации его структуры [1]. Стабильность савиназы можно модулировать путем добавления в раствор осмолитов [2], но этот подход не является универсальным, дает ограниченный эффект и не всегда подходит для промышленного использования.

Для повышения стабильности белков методами белкового инжиниринга обычно используют оптимизацию внутримолекулярных взаимодействий, например, через переупаковку гидрофобного ядра или создание новых дисульфидных, водородных или ионных связей. Кроме того, повышение стабильности белков можно осуществить посредством оптимизации поверхностных заряд-зарядовых взаимодействий. Данный подход был успешно апробирован, например, для фермента ксиланаза из *Bacillus subtilis* [3].

В данной работе был проведен *in silico* поиск и анализ мутантных форм повышенной термостабильности савиназы путём оптимизации ее поверхностных заряд-зарядовых взаимодействий.

Методы и алгоритмы: Структура савиназы (UniProt ID: P29600) была взята из Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), PDB ID: 1SVN. Вклад в изменение энергии Гиббса в процессе денатурации 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/tksamc>) при pH 8.0 и 27 °C [4] как полная энергия электростатического взаимодействия отдельных пар ионизированных аминокислотных остатков на основании статистической суммы всех возможных ионизированных состояний при данном pH. При этом предполагалось, что в полностью развернутом состоянии электростатическое взаимодействие отсутствует. На дестабилизирующий вклад в структуру белка ионизированных аминокислотных остатков указывает значение вклада данной пары остатков i и j $\Delta E_{ij} > 0$, а также $SASA_{ij} > 50\%$ (Solvent-Accessible Surface Area – средняя площадь поверхности пары остатков, доступная растворителю) [5]. Структуры мутантных форм белка были получены с помощью программы AlphaFold 2 (<https://www.alphafold.ebi.ac.uk>) [6].

Результаты: Анализ профиля ΔG_{qq} , полученного для савиназы с помощью TKSA-MC, показал, что аминокислотные остатки Lys229, Lys231 и Lys245 на поверхности белковой молекулы вносят вклад в ее дестабилизацию. Кроме того, электростатическое отталкивание между остатками лизина с одной стороны и остатками гистидина и аргинина с другой (Lys229:His118; Lys231:Arg269; Lys245:Arg241; Lys245:His243) понижает стабильность белковой молекулы. Инверсия заряда путём замены этих остатков на отрицательно заряженную аспарагиновую кислоту (Asp) должна способствовать повышению стабильности фермента, что количественно выражается в изменении ΔG_{qq} в результате мутации $\Delta \Delta G_{wt \rightarrow mut} = \Delta G_{mut} - \Delta G_{wt}$. Анализ мутации Lys229Asp показал, что она не вносит существенного вклада в изменение стабильности белка ($\Delta \Delta G_{Lys229Asp} = 0.77$ кДж/моль). Замена Lys231Asp приводит к дестабилизации савиназы ($\Delta \Delta G_{Lys231Asp} = 14.49$ кДж/моль), в то время как мутация Lys245Asp приводит к повышению стабильности фермента ($\Delta \Delta G_{Lys245Asp} = -1.70$ кДж/моль). Двойные мутации не способствуют повышению стабильности савиназы (Lys229Asp+Lys231Asp: $\Delta \Delta G_{229+231} = 2.52$ кДж/моль; Lys231Asp+Lys245Asp: $\Delta \Delta G_{231+245} = 4.92$ кДж/моль). Добавление точечной замены Lys229Asp к Lys245Asp не влияло на значение $\Delta \Delta G$ по сравнению с одиночной заменой в положении 245 ($\Delta \Delta G_{229+245} = -1.70$ кДж/моль). Замена всех трёх остатков (Lys229Asp, Lys231Asp, Lys245Asp) способствовала значительному повышению стабильности белковой молекулы: $\Delta \Delta G_{229+231+245} = -7.98$ кДж/моль. Отметим, что проведенные точечные мутации также привели к более «выгодным» электростатическим взаимодействиям с соседними положительно заряженными аминокислотами. Для аминокислотных остатков His118 и His243, расположенных в трехмерной структуре близко к Asp229 и Asp245, значение ΔG изменилось с 0.00 до -4.88 кДж/моль и до -3.97 кДж/моль соответственно, что также устранило дестабилизирующие взаимодействия.

Выводы: Таким образом, в данной работе был проведен анализ вклада поверхностных электростатических взаимодействий заряженных

аминокислотных остатков савиназы. Были выбраны точечные замены, потенциально приводящие к повышению стабильности фермента. Полученные данные будут в дальнейшем использованы для дизайна и анализа мутантных форм савиназы повышенной термостабильности.

***In silico* search and analysis of mutant forms of increased thermostability of the industrially important enzyme savinase from *Bacillus lentus* by optimizing its surface charge-charge interactions**

Velichko A.A.*, Milovidov G.D., Deryusheva E.I., Shevelyova M.P., Nemashkalov V. A.

Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

* *vaconf13@yandex.ru*

Key words: savinase; electrostatic interactions; thermal stability; TKSA-MC; AlphaFold

Motivation and Aim: Enzymes are widely used in various industrial sectors for processing raw materials. Compared to traditional chemical processes, biochemical approaches to the implementation of technological processes make it possible to achieve a higher yield of the target product due to high catalytic activity and specificity of enzymes, as well as economic and environmental advantages due to milder conditions and reduction in toxicity and volume of waste. Proteases, which cause cleavage of peptide bonds and hydrolyze proteins into small peptides and amino acids, are used in treatment of leather and fabrics, improving of feed digestibility and food quality, and in the production of detergents and biofuels. Increasing their stability and activity under industrial conditions is one of the main tasks of modifying this class of proteins. The enzyme savinase is a serine protease secreted by the alkaliphilic bacterium *Bacillus lentus* and is widely used in detergents as an additive to remove protein stains. Its optimal operating temperature range is 30–70 °C and pH 8–12. The protein binds two calcium ions, which, along with seven salt bridges between ionized amino acid residues, help stabilize its structure [1]. The stability of savinase can be modulated by adding osmolytes to the solution [2], but this approach is not universal, has a limited effect and is not always suitable for industrial use.

To increase the stability of proteins, engineering methods usually use optimization of intramolecular interactions, for example, through repacking of the hydrophobic core or the creation of new disulfide, hydrogen or ionic bonds. The increase of protein stability can also be achieved by optimizing surface charge-charge interactions. This approach has been successfully tested, for example, for the xylanase from *Bacillus subtilis* [3].

In this work, an *in silico* search and analysis of mutant forms of increased thermal stability of savinase was carried out by optimizing its surface charge-charge interactions. **Methods and Algorithms:** The structure of savinase (UniProt ID: P29600) was taken from the Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), PDB ID: 1SVN. The contribution to the Gibbs energy change during protein denaturation caused by charge-charge interactions, ΔG_{qq} , was calculated using the TKSA-MC program (Tanford-Kirkwood

Solvent Accessibility model with the Monte Carlo method) (<https://github.com/contessoto/tksamc>) at pH 8.0 and 27 °C [4] as the total energy of electrostatic interaction of individual pairs of ionized amino acid residues based on the partition function of all possible ionized states at a given pH. It was assumed that in the fully denatured state there is no electrostatic interaction. The destabilizing contribution of ionized amino acid residues to the protein structure is indicated by the contribution of a given pair of residues i and j $\Delta E_{ij} > 0$, as well as $SASA_{ij} > 50\%$ (Solvent-Accessible Surface Area) [5]. The structures of mutant forms of the protein were obtained by AlphaFold 2 program (<https://www.alphafold.ebi.ac.uk>) [6].

Results: Analysis of the ΔG_{qq} profile obtained for savinase using TKSA-MS showed that the amino acid residues Lys229, Lys231 and Lys245 on the protein surface contribute to its destabilization. In addition, electrostatic repulsion between pairs of lysine residues with histidine or arginine residues (Lys229:His118; Lys231:Arg269; Lys245:Arg241; Lys245:His243) reduces the stability of the protein molecule. Charge inversion by replacing these residues with negatively charged aspartic acid (Asp) should increase the stability of the enzyme, which is quantified by the change in ΔG_{qq} because of the mutation $\Delta\Delta G_{wt \rightarrow mut} = \Delta G_{mut} - \Delta G_{wt}$. Analysis of the Lys229Asp mutation showed that it does not significantly contribute to protein stability ($\Delta\Delta G_{Lys229Asp} = 0.77$ kJ/mol). The Lys231Asp substitution leads to destabilization of savinase ($\Delta\Delta G_{Lys231Asp} = 14.49$ kJ/mol), while the Lys245Asp mutation leads to increased enzyme stability ($\Delta\Delta G_{Lys245Asp} = -1.70$ kJ/mol). Double mutations do not increase the stability of savinase (Lys229Asp+Lys231Asp: $\Delta\Delta G_{229+231} = 2.52$ kJ/mol; Lys231Asp+Lys245Asp: $\Delta\Delta G_{231+245} = 4.92$ kJ/mol). The addition of a substitution Lys229Asp to Lys245Asp had no effect on the $\Delta\Delta G$ value compared to a point substitution at position 245 ($\Delta\Delta G_{229+245} = -1.70$ kJ/mol). The replacement of all the residues (Lys229 Asp, Lys231Asp, Lys245Asp) led to a significant increase in the stability of the protein molecule: $\Delta\Delta G_{229+231+245} = -7.98$ kJ/mol. Note that the point mutations also led to more “favorable” electrostatic interactions with neighboring positively charged amino acids. For amino acid residues His118 and His243, located in the tertiary structure close to Asp229 and Asp245, the ΔG value changed from 0.00 to -4.88 kJ/mol and to -3.97 kJ/mol, respectively, which also eliminated destabilizing interactions.

Conclusion: Thus, in this work, the contribution of surface electrostatic interactions of charged amino acid residues of savinase was analyzed. Point substitutions that potentially lead to increased enzyme stability were selected. The data obtained will be further used for the design and analysis of mutant forms of savinase with increased thermostability.

Список литературы/References

1. Betzel C. et al. Crystal structure of the alkaline proteinase SavinaseTM from *Bacillus lentus* at 1.4 Å resolution. *J Mol Biol.* 1992;223(2):427-445
2. Nasiripourdori A. et al. Co-solvent effects on structure and function properties of savinase: Solvent-induced thermal stabilization. *Int J Biol Macromol.* 2009;44(4):311-315
3. Ngo K. et al. Improving the Thermostability of Xylanase A from *Bacillus subtilis* by Combining Bioinformatics and Electrostatic Interactions Optimization. *J Phys Chem B.* 2021;125(17):4359-4367
4. Contessoto V.G. et al. TKSA-MC: A web server for rational mutation through the optimization of protein charge interactions. *Proteins.* 2018;86(11):1184-1188
5. Loladze V.V. et al. Engineering a Thermostable Protein via Optimization of Charge – Charge Interactions on the Protein Surface. *Biochemistry.* 1999;38(50):16419-16423
6. Mirdita M. et al. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods.* 2022;19(6):679-682