

Подбор условий кристаллизации химозинов жвачных животных

Миронова Е.^{1, 2*}, Колыбалов Д.¹, Архипов С.¹, Дюсенова С.¹, Шевцов М.³,
Беленькая С.⁴, Волосникова Е.⁴, Борщевский В.³, Щербаков Д.⁴

¹ Центр коллективного пользования «Сибирский кольцевой источник фотонов»
Института катализа и адсорбции СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

⁴ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск, Россия

* mironovaforwork@gmail.com

Ключевые слова: кристаллизация; белок; химозин; рентгеноструктурный анализ

Мотивация и цель: Химозин представляет собой белок класса пептидаз, который активно используется в пищевой промышленности. Ранее для производства сыра за счет селективного процесса створаживания молока использовали химозин, содержащийся в измельченных сычугах юных телят, однако в настоящее время основной объем этого фермента получают биотехнологическим способом. Для химозинов различных видов наблюдается разная специфичность к каппа-казеину коровьего молока, в случае химозина верблюда превышающая даже показатели родного фермента [1]. Целью нашей работы является поиск условий кристаллизации ряда химозинов различных жвачных (алтайский марал, северный олень, архар) для их дальнейшего рентгеноструктурного анализа. Полученные данные позволят уточнить предполагаемый механизм действия фермента, а также провести анализ факторов, влияющих на субстратную специфичность.

Методы и алгоритмы: Кристаллизация химозинов алтайского марала, лося, архара и северного оленя проводилась методом сидячей капли. Для формирования капель использовался робот NT8 Drop Setter (Formulatrix, США). В качестве растворов осадителей были выбраны коммерчески доступных скрининговые наборы для кристаллизации: Pact Premier, Crystal Screen, Index, SG1, JCSG+ (Molecular Dimensions, Великобритания). Процедура скрининга включала в себя также варьирование соотношения объема раствора белка и осадителя. Для химозина алтайского марала выполняли рентгеноструктурный анализ с использованием синхротронного излучения. Съемку проводили на станции синхротронного источника излучения ID23-1 ESRF (Гренобль, Франция).

Результаты: Подобраны условия кристаллизации химозина марала, лося и архара. Кристаллы химозина марала были получены в следующих условиях: 0.2 М CaCl₂, 0.1 М Tris (pH 8.0), 20 % w/v PEG 6000; химозина лося – 0.2 М CaCl₂, 0.1 М ацетат натрия (pH 5.0), 20 % (w/v) PEG 6000 [1]; химозина архара – 0.01 М ZnSO₄, 0.1 М MES (pH 6.5), 25 % v/v PEG 550; 0.05 М ацетат цинка, 20 % w/v PEG 3350. Подобрать условия кристаллизации химозина северного оленя на данный момент не получилось. Возможно, это связано с малой концентрацией раствора исходного белка. Был выполнен рентгеноструктурный анализ полученных кристаллов в Европейском центре синхротронного излучения и в Шанхайском центре синхротронного излучения. Для химозина марала была расшифрована

кристаллическая структура и задепонирована в PDB (PDB ID: 8CIK). В случае химозина лося удалось определить только параметры элементарной ячейки. Для химозина архара в настоящее время ведутся работы по уточнению структурной модели.

Выводы: Были подобраны условия кристаллизации химозинов марала, лося и архара. Для химозина северного оленя требуется дальнейший поиск условий кристаллизации. Есть предположение, что оптимизация процедуры криопротектирования кристаллов химозина лося позволит получить от выращенных кристаллов набор дифракционных данных, с помощью которого можно будет выполнить решение и уточнение соответствующей структуры. Была расшифрована и задепонирована структура химозина марала.

Финансирование: Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для ЦКП «СКИФ» ИК СО РАН (FWUR-2024-0040).

Шевцов М. и Борщевский В. выражают благодарность за поддержку Министерству науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-03-2024-117, проект FSMG-2024-0012).

Screening for crystallization conditions of ruminant's chymosins

Mironova E.^{1,2*}, Kolybalov D.¹, Arkhipov S.¹, Diusenova S.¹, Shevtsov M.³, Belenkaya S.⁴, Volosnikova E.⁴, Borshchevskiy V.³, Shcherbakov D.⁴

¹ Synchrotron Radiation Facility – Siberian Circular Photon Source “SKIF”

Boreskov Institute of Catalysis, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

⁴ The State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Novosibirsk, Russia

* mironovaforwork@gmail.com

Key words: crystallization; protein; chymosin; X-ray diffraction analysis

Motivation and Aim: Chymosin is a protein of the peptidase class, which is actively used in the food industry. Previously, chymosin contained in the crushed rennet of young calves was used for the production of cheese due to the selective process of milk coagulation, but currently the bulk of this enzyme is obtained by a biotechnological method. For different types of chymosins, different specificity to cow's milk kappa casein is observed, in the case of camel chymosin, even exceeding the parameters of the native enzyme [1]. The purpose of this work is to search for conditions for the crystallization of a number of chymosins of various ruminants (Altai maral, reindeer, argali) for their further X-ray diffraction analysis. The obtained data will clarify the proposed mechanism of action of the enzyme, as well as analyze the factors affecting substrate specificity.

Methods and Algorithms: Crystallization of chymosins of Altai maral, elk, argali and reindeer was carried out by the sitting-drop method. The NT8 Drop Setter robot (Formulatrix, USA) was used to form droplets. Commercially available screening kits for crystallization were selected as precipitant solutions: Pact Premier, Crystal Screen, Index, SG1, JCSG+ (Molecular Dimensions, England). The screening procedure also

included varying the volume ratio of the protein solution and precipitant. X-ray diffraction analysis using synchrotron radiation was performed for the Altai maral chymosin. The experiment was carried out at the station of the synchrotron radiation source ID 23-1 ESRF (Grenoble, France).

Results: Conditions of crystallization of chymosin of maral, elk and argali were selected. Maral chymosin crystals were obtained under the following conditions: 0.2 M CaCl₂, 0.1 M Tris (pH 8.0), 20 % w/v PEG 6000; moose chymosin – 0.2 M CaCl₂, 0.1 M sodium acetate (pH 5.0), 20 % (w/v) PEG 6000 [1]; argali chymosin – 0.01 M ZnSO₄, 0.1 M MES (pH 6.5), 25 % v/v PEG 550; 0.05 M zinc acetate, 20 % w/v PEG 3350. It has not been possible to select the conditions for crystallization of reindeer chymosin at the moment, perhaps due to the low concentration of the initial protein solution. X-ray diffraction analysis of the obtained crystals was performed at the European Synchrotron Radiation Center and at the Shanghai Synchrotron Radiation Center. The crystal structure of the maral chymosin was deciphered and deposited in PDB (PDB ID: 8 CIK). In the case of elk chymosin, it was possible to determine only the parameters of the unit cell. For argali chymosin, work is currently underway to refine the structural model.

Conclusion: The conditions of crystallization of the chymosins of maral, elk and argali were selected. Further search for crystallization conditions is required for reindeer chymosin. It is assumed that optimization of the cryoprotection procedure for moose chymosin crystals will allow obtaining a set of diffraction data from grown crystals, using which it will be possible to solve and refine the corresponding structure. The structure of the maral chymosin was deciphered and deposited.

Funding: This work was performed within the framework of a budget project of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for Synchrotron radiation facility SKIF, Boreskov Institute of Catalysis (FWUR-2024-0040).

Shevtsov M. and Borshchevskiy V. express gratitude for the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-03-2024-117, project FSMG-2024-0012).

Список литературы/References

1. Balabova D.V., Belash E.A., Belenkaya S.V., Shcherbakov D.N., Belov A.N. et al. Biochemical Properties of a Promising Milk-Clotting Enzyme, Moose (*Alces alces*) Recombinant Chymosin. *Foods*. 2023;12(20):3772. doi 10.3390/foods12203772