

Рекомбинантная экспрессия гена кутиназы из *Aureobasidium pullulans* и увеличение ее поликапролактон-деградирующей активности посредством сайт-специфического мутагенеза

Научный руководитель – Сизова Ирина Алексеевна

Ермилов Ф.К.¹, Кульминская А.А.²

1 - Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Курчатовский институт, Москва, Россия, *E-mail: ermilov.filipp03@gmail.com*; 2 - Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Курчатовский институт, Москва, Россия, *E-mail: kulminskaya_aa@npi.nrcki.ru*

Кутиназы - группа ферментов, природным субстратом которых является кутин. Данную группу относят к семейству α/β гидролаз, которая содержит липазы и эстеразы. Однако, в сравнении с последними, кутиназы способны распознавать более широкий спектр субстратов, включая биоразлагаемый полимер поликапролактон (PCL) [2].

Целью нашей работы является создание штамма *Komagataella phaffi* - эффективного продуцента кутиназы ApCUT1 из *Aureobasidium pullulans* ВКМ 1116, обладающей PCL-деградирующей активностью. Задача настоящего этапа работы - повышение активности кутиназы ApCUT1 посредством сайт-специфического мутагенеза.

Предсказание аминокислотных замен, которые могут привести к повышению PCL-деградирующей активности у ApCUT1, провели на основе BLAST-анализа с высокоомологичной кутиназой из *Cryptococcus sp. S-2* (CrCUTS-2) (69%). Ранее с использованием молекулярного моделирования и сайт-направленного мутагенеза показано, что аминокислотные замены F52W и L181F в белке CrCUTS-2 в 2 – 3 раза стимулируют гидролиз специфических гидрофобных субстратов pNP-палмитата и pNP-бутирата [1]. Выравнивание аминокислотных последовательностей ApCUT1 и CrCUTS-2 позволило предположить, что аминокислотные замены Y77W, L205F, Y77W/L205F у ApCUT1 будут стимулировать кутиназную активность.

Кодирующая последовательность (CDS) кутиназы ApCut1 была сконструирована с использованием данных геномной базы MucosCosm и приготовлена с помощью ПЦР на матрице хромосомной ДНК *A. pullulans* ВКМ 1116. В полученную CDS были внесены замены для получения генов с необходимыми мутациями, наличие которых было подтверждено посредством секвенирования.

Затем, ПЦР-фрагменты были проклонированы в экспрессионном векторе и полученная плаزمиды была трансформирована в клетки *K. phaffi* с последующей селекцией многокопийных клонов. Отобранные клоны были выращены в жидкой среде с индуктором. Активность фермента дикого типа и мутантных белков определялась влиянием культуральной жидкости (КЖ) на эффективность расщепления специфичного для кутиназ субстрата и деградацию PCL на агаризованной среде.

В результате работы были получены трансформанты *K. phaffi*, эффективно экспрессирующие ген дикого типа (*ApCut1*) и мутантные гены (*Y77W*, *L205F* и *Y77W/L205F*), а также секретирующие в КЖ соответствующие белки. По результатам оценки активности белков, можно сделать вывод, что исследуемые замены не препятствуют связыванию фермента с субстратом и оказывают существенное позитивное влияние на PCL-деградирующую активность.

Источники и литература

- 1) Crystal structure and enhanced activity of a cutinase-like enzyme from *Cryptococcus* sp. strain S-2 / Y. Kodama, K. Masaki, H. Kondo [et al.] // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 77. – № 3. – P. 710-717.
- 2) Screening Enzymes That Can Depolymerize Commercial Biodegradable Polymers: Heterologous Expression of *Fusarium solani* Cutinase in *Escherichia coli* / F. Santos-Beneit, L. M. Chen, S. Bordel [et al.] // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11. – № 2.