

ПОИСК И СОЗДАНИЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ В ЭПОХУ БИОИНФОРМАТИКИ И ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА

В.И. Тишкова, Д.Л. Атрошенко, А.А. Пометун, С.С. Савин

ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
химический факультет, Москва, Россия,

Ферменты являются уникальными высокоэффективными и селективными биокатализаторами. Развитие методов генетической инженерии позволило решить проблему стоимости их получения, а эксперименты по белковой инженерии во многих случаях завершились созданием биокатализаторов с повышенной стабильностью к внешним факторам (температура, кислоты и щелочные рН, органические растворители и т.д.). Высокая специфичность ферментов одновременно является их и сильной, и слабой стороной. Проблема получения биокатализаторов, высокоактивных и специфичных к неприродным субстратам до сих пор является одной из самых труднорешаемых (а часто и просто нерешаемой) проблемой. Метод направленной эволюции является наглядным примером насколько это процесс трудоемкий и дорогой. В настоящее время этот подход практически вытеснен методом рационального дизайна, однако для последнего требуется исходный фермент со свойствами очень близкими к целевым. Можно привести и обратный пример «антиселективности», когда широкая субстратная специфичность оксидаз D-аминокислот (DAAO) не позволяет создать биосенсоры на определенные D-ак, которые являются маркерами важнейших нейродегенеративных, гормональных и других заболеваний.

В настоящее время широко используется подход поиска гомологичных ферментов в базе транслированных последовательностей, однако такой подход в чистом виде очень часто малоэффективен, поскольку многие ферменты имеют низкую гомологию (часто всего 20-25%), что не позволяет их отличить от близкородственных. Кроме того, на основании такого подхода нельзя выбрать фермент со свойствами наиболее близкими к желаемым. В данном докладе мы представим результаты наших экспериментов по совмещению поиска по гомологиям со структурным моделированием на основе Искусственного интеллекта (ИИ) с помощью алгоритмов AlphaFold2 и AlphaFold3. На примере DAAO будет показана высокая точность моделирования новых структур, что позволяет установить пространственный критерий для дискриминации DAAO и близкородственной глицинооксидазы (GO), возможность выявления “fingerprint” участков, присутствующих в DAAO и отсутствующих в GO. Моделирование структур известных DAAO позволяет установить взаимосвязь «структура-функция» и проводить поиск ферментов с необходимой и даже новой субстратной специфичностью. С помощью данного подхода была найдена новая DAAO высокоспецифичная к D-Phe для диагностики гестационного диабета. Впервые в мире ген DAAO был идентифицирован в геноме архей. Оказалось, что это первый описанный фермент, способный окислять не только свободные D-ак, но и их моно-, ди- и три-метилированные по атому азота производные.

Сочетание биоинформационного поиска и ИИ было применено нами и для создания биокатализатора на основе формиадегидрогеназы (FDH) для выполнения Госзадания "Определение кофермента никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺) в биологических образцах для определения статуса организма" в рамках национального проекта «Новые технологии сохранения здоровья». Было необходимо получить препарат FDH, который одновременно должен был 1) быть высокоспецифичен к обоим субстратам (НАД⁺ и формиад), 2) иметь высокоэффективные каталитические параметры: 3) стабилен к действию химических агентов и протеаз; 4) термостабилен и 5) храниться в растворе не менее года при +4 °С. В отличие от DAAO FDH является высокогомологичным ферментом и простой поиск по гомологии позволяет получить несколько десятков тысяч последовательностей. Однако на его основе нельзя выбрать нужный фермент. В данном случае поиск по гомологии проводился по отдельным участкам длиной около 60 ак, в которых должны были находиться критические для катализа и стабильности остатки. В результате был выбран не конкретный фермент, а построен «портрет» наиболее перспективной FDH, для которого была построена пространственная структура для апо- и холо-форм, на основании анализа которых была проведена дополнительная оптимизация последовательности. Ак-последовательность была транслирована в нуклеотидную. Ген искусственной FDH был синтезирован и экспрессирован в клетках *E.coli*. Предварительные результаты свидетельствуют о достижении целевых параметров.

Аналогичный подход – сочетание биоинформатики и ИИ был использован при поиске высокостабильных аминоксидаз. В результате были получены новые ферменты, которые были стабильны до 83 °С.

Работа выполнена в рамках Госзадания КБК 386 0908 012С4 73790 611 12