

Создание набора мутантных вариантов олигопептидазы В *S. Proteamaculans* для определения факторов, стабилизирующих и нарушающих конформацию каталитического центра фермента.

Ю.К. Агапова¹, В.И. Тимофеев¹, А.В. Власкина¹, Т.В. Ракитина¹
¹НИЦ Курчатовский Институт

Объектом нашего исследования является сериновая пептидаза бактерии *S. proteamaculans* (PSP), которая относится к семейству олигопептидаз В (OpdB) [1]. OpdB имеют трипсиноподобную субстратную специфичность и гидролизует пептидные связи, образованные остатками Arg/Lys. Наиболее предпочтительными для гидролиза остатками в Р2 положении субстрата также являются Arg или Lys.

Наш интерес к PSP связан с биотехнологическим потенциалом данного фермента, который может быть использован для получения ряда физиологически активных пептидов. Введение в биотехнологический процесс нового фермента требует его углублённого исследования и очень часто дополнительной оптимизации его физико-химических свойств, а также эффективности и субстратной специфичности.

Предложения о необходимых изменениях аминокислотной последовательности фермента обычно выдвигаются на основании анализа его первичной и пространственной структуры, а при отсутствии последней - на основании доступных пространственных структур гомологов. Так как на настоящий момент нам не удалось закристаллизовать PSP, то было проведено моделирование трехмерной структуры PSP на основании 3D-структур протозойных OpdB. При анализе полученной модели было установлено, что в PSP (как и в других бактериальных OpdB) отсутствуют межмолекулярные солевые мосты, характерные для протозойных OpdB и регулирующие переход неактивной формы фермента в активную.

В рамках данной работы нами был создан и набор мутантных вариантов PSP, в которых заряженные остатки, потенциально способные образовать солевые мосты, были заменены на незаряженные. Анализ активности и субстратной специфичности мутантов позволил выявить факторы, стабилизирующие и нарушающие оптимальную конформацию каталитического центра фермента.

Литература.

1. Михайлова, Биохимия 2015