

Исследование молекулярных механизмов, определяющих специфичность рекомбинантной папаин-подобной протеиназы пшеницы тритикаина- α

Научный руководитель – Замятнин Андрей Александрович

Петушкова Анастасия Игоревна

Студент (магистр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра молекулярной биологии, Москва, Россия

E-mail: asyapeti@gmail.com

Тритикаин- α - протеолитический фермент из пшеницы (*Triticum aestivum* L), принадлежащий к семейству папаин-подобных цистеиновых протеиназ. Принято считать, что тритикаин- α принимает участие в процессинге основных запасующих белков эндосперма (глютена). Цель нашей работы заключается в характеристике специфичности действия фермента и определении параметров его каталитической активности, что в перспективе поможет создать средство энзиматической терапии глютеневой непереносимости, в первую очередь, целиакии.

Кинетика ферментативной активности тритикаина- α , измерялась с различными флуорогенными субстратами (АМС - флуорогенная метка). Последовательности таких субстратов отбирались на основе данных о сайтах расщепления тритикаином- α коллагена и глютена.

Так как точная структура тритикаина альфа не известна, то для ее восстановления мы использовали методы гомологичного моделирования. Взаимодействие сконструированного фермента с пептидными субстратами изучали при помощи метода моделирования молекулярного докинга.

В результате проведенных экспериментов выяснилось, что наиболее предпочтительными субстратами фермента являются: Ac-PLVQ-AMC, Ac-QLLR-AMC, Vz-FVR-AMC. Более низкая эффективность расщепления субстрата Ac-VLPQ-AMC, также содержащего гидрофобную аминокислоту вероятно связана с конформационными ограничениями, из-за наличия пролина в положении P2. Также выяснилось, что тритикаин- α не расщепляет субстрат Ac-FESR-AMC. Вместе такие результаты указывают на необходимость наличия гидрофобного аминокислотного остатка в положении P2 субстрата. Результаты докинга выявили, что Ac-DEVD-NME, Ac-PLVQ-NME, Ac-QLLR-NME и Ac-VLPQ-NME способны связываться с активным центром протеиназы сходным образом: их карбонильные группы, которые, как предполагается, могут быть атакованы каталитической серой цистеина, располагаются одинаково, в то время как боковые цепи их аминокислотных остатков в P2 положении расположены в гидрофобном кармане. При этом энергия связывания субстрата Ac-PLVQ-NME самая низкая по сравнению с энергиями связывания остальных проанализированных субстратов. В то же время субстраты Ac-FVR-NME и Ac-FESR-NME связываются в активном центре фермента иначе.

Таким образом, мы выяснили, что субстратная специфичность тритикаина-альфа определяется наличием гидрофобного аминокислотного остатка в положении P2. Рассчитанные энергии связывания коррелируют с эффективностью расщепления субстратов, расположение цепей которых в активном центре фермента сходно. В дальнейшем планируется продолжить изучение структурных особенностей тритикаина-альфа, определяющих его специфичность, анализируя влияние физико-химические параметров реакционной смеси на кинетику расщепления ферментом различных субстратов.