

Исследование субстратной специфичности рекомбинантных AAA-протеаз

Научный руководитель – Смирнова Евгения Владимировна

Ельмеева Ольга Сергеевна

Студент (магистр)

МИРЭА - Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий, Кафедра биотехнологии и промышленной фармации, Москва, Россия

E-mail: elmeeva.o.s@mail.ru

AAA-протеазы [1] представляют собой основные составляющие митохондриальной протеолитической системы и выполняют как контроль качества, так и регуляторные функции.

Создание конструкций, экспрессирующих митохондриальные AAA-протеазы, и комплексное исследование позволит предсказывать иммунодоминантные эпитопы, способные выщепляться из соответствующих аутоантигенов или вирусных белков митохондриальными протеазами.

В ходе работы были сконструированы генетические векторы на основе плазмиды pET32b, несущие последовательности митохондриальных АТФ-зависимых протеаз (SPG7, AFG3L2, YME1L, LONP1, ClpX и ClpP). Все целевые гены клонировали с 6xHis тагом и сайтом протеолиза TEV. Экспрессию рекомбинантных белков осуществляли в штамме *E. coli* BL21(DE3). В процессе исследования оптимизированы условия экспрессии и разработана методика выделения протеаз в активной форме. Использовали двухступенчатую хроматографическую очистку: ИМАС с последующим рефолдингом на смоле и далее SEC.

Характеристику протеаз проводили исследованием и измерением кинетической активности гидролиза субстратов LLVY, RLR, LLE, PAL, AAF и ПерТВЕ на приборе CLARIOstar. Гидролиз субстратов рекомбинантными AAA-протеазами проводили в присутствии 5 мМ Mg²⁺, 25 мкМ Zn²⁺ и 7,5 мМ АТФ.

На рисунке 1 видно, что протеаза ClpX обладает наименьшей специфичностью, расщепляя субстраты LLVY, RLR и AAF. Тогда как гетероолигомерный комплекс ClpP/X расщепляет только RLR. Протеаза LONP1 также расщепляет только RLR, а для специфичного ее субстрата – ПерТВЕ получена концентрационная зависимость.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 24-74-10107).

Источники и литература

- 1) Levytskyy R. M., Bohovych I., Khalimonchuk O. Metalloproteases of the inner mitochondrial membrane //Biochemistry. 2017. Т. 56. №. 36. С. 4737-4746.

Иллюстрации

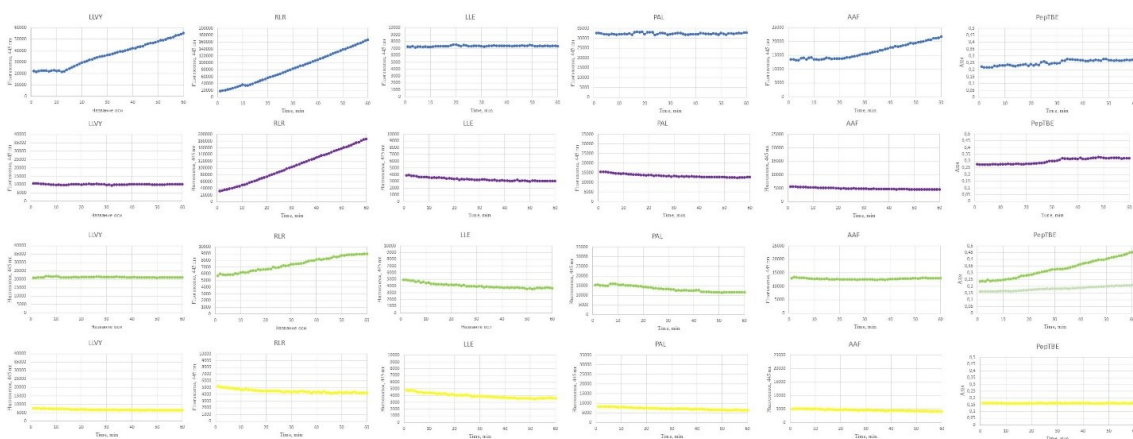


Рис. : Результат гидролиза субстратов рекомбинантными AAA-протеазами. По вертикали обозначены субстраты LLVY, RLR, LLE, PAL, AAF и PepTBE соответственно, цветом обозначены анализируемые протеазы: синий – ClpP, фиолетовый - ClpP/X, зеленый - LONP1, желтый – контроль.