

Белковая инженерия пенициллинацилазы из *E. Coli*

Панин Николай Владимирович

Сотрудник компании

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

E-mail: npanin@gmail.com

БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ ИЗ *ESCHERICHIA COLI*.

Панин Н.В., Забильская А.В., Щербакова Т.А., Суплатов Д.А., Кудрявцев П.В., Шведас В.К.

НИИ ФХБ им.А.Н.Белозерского, г. Москва, panin@belozersky.msu.ru

Пенициллинацилаза из *Escherichia Coli* широко используется в фармацевтической промышленности в реакции гидролиза природных пенициллинов для получения бета-лактамных ядер. Проводятся разработки по использованию пенициллинацилазы в реакциях синтеза при ацилировании широкого круга аминсоединений, для получения полусинтетических антибиотиков, разделения рацематов хиральных соединений, пептидного синтеза и др. Однако такие факторы, как наличие побочных реакций гидролиза, низкая специфичность и стереоспецифичность к неприродным субстратам, снижение стабильности в области высоких концентраций реагентов и pH, во многом ограничивают возможности фермента. Среди возможных путей решения проблемы использование белковой инженерии, как мощного и тонкого инструмента направленного изменения свойств фермента отличных от природной функции, представляется оптимальным и перспективным.

В данной работе были использованы последние представления о структуре и механизме действия фермента, а также современные вычислительные и биоинформатические методы, что позволило выявить горячие точки мутагенеза. Нами были получены и экспериментально изучены новые мутанты пенициллинацилазы, характеризующиеся заметным улучшением каталитической активности, эффективности ацильного переноса, стереоспецифичности в реакциях с аминспиртами, щелочной и операционной стабильности. Так, мутация bF256R приводит к 4-х кратному улучшению эффективности ацильного переноса, что может найти свое применение в препаративном биокаталитическом синтезе полусинтетических бета-лактамных антибиотиков. Мутация bF71A приводит к увеличению стереоселективности пенициллинацилазы по отношению к S-фенилацетилфенилаланинолу более чем на 2 порядка, что можно использовать в биокаталитическом разделении энантиомеров аминспирта. Замена bD484N приводит к 10-и кратному увеличению стабильности при pH 10, а также при высоких концентрациях реагентов, что расширяет границы применимости фермента в реакциях ацилирования аминсоединений.

Источники и литература

- 1) Shcherbakova T.A., Panin N.V., Suplatov D.A., Shapovalova I.V., Svedas V.K. The D484N mutant of penicillin acylase from *Escherichia coli* is more resistant to inactivation by substrates and can effectively perform peptide synthesis in aqueous medium // J. Mol. Catal. - B Enzym. 2015. T. 112. С. 66–68 10.1016/j.molcatb.2014.11.015.
- 2) Щербакова Т., Панин Н., Гуранда Д., Шведас В. Способ синтеза пептидов, в том числе бета-лактамных антибиотиков, при использовании варианта пенициллинацилазы // Патент RU2537845 С2 от 10.01.2015. Патентообладатель “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.” 2015.

- 3) Suplatov D., Panin N., Kirilin E., Shcherbakova T., Kudryavtsev P., Švedas V. Computational Design of a pH Stable Enzyme: Understanding Molecular Mechanism of Penicillin Acylase's Adaptation to Alkaline Conditions // PlosOne. 2014. Т. 9. № 6. С. e100643.

Слова благодарности

Выражаю благодарность проф. Тишкову В.И. (МГУ им. М.В.Ломоносова), Курочкиной Л.П. (ИБХ им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова), Друца В.Л. (НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского)