

Влияние мутаций на связывание кальция эндолизином бактериофага T5**Научный руководитель – Микулинская Галина Викторовна****Коваленко Ангелина Олеговна***Студент (магистр)*

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

E-mail: gertrude-mcfuzz@mail.ru

В связи с появлением большого числа антибиотикоустойчивых микроорганизмов перспективным направлением представляется поиск новых способов борьбы с патогенами. Так, альтернативой антибиотикам могут служить эндолизины бактериофагов - ферменты, гидролизующие пептидогликан клеточных стенок бактерий. Для успешного применения на практике фермент важно охарактеризовать с биохимической точки зрения. В данной работе мы исследовали ранее не изучавшуюся кальциевую регуляцию эндолизина бактериофага T5 (EndoT5). Этот фермент является Ca^{2+} -зависимой цинксодержащей L,D-пептидазой семейства M15.

С целью изучить роль некоторых полярных аминокислотных остатков в связывании Ca^{2+} проводили сайт-направленный мутагенез с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Были получены следующие мутантные белки: D113A, N115A, N115D, D130A и S117A. Методами ионообменной хроматографии белки были очищены до состояния электрофоретической гомогенности.

Ферментативную активность измеряли спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности суспензии клеток *Escherichia coli*, пермеабелизованных хлороформом. Мутантные белки по активности отличаются от нативного фермента. Так, мутант N115D имеет удельную активность, примерно в 5 раз меньшую, чем у нативного белка EndoT5; мутанты N115A и S117A имеют активность, примерно в 40 раз меньшую в сравнении с EndoT5. Мутант D113A обладает только остаточной активностью. Мутант D130A лишен гидролитической активности.

Нативному белку EndoT5 свойственна температурная устойчивость, которую проявляют и мутантные белки: они сохраняют ферментативную активность после прогрева. В случае неактивного мутанта D130A наблюдается сходство спектров кругового дихроизма (КД) до и после прогрева, что указывает на восстановление структуры после температурной денатурации.

Для исследования кальциевой регуляции мы оценивали влияние на активность ферментов металлохелатора ЭДТА. Было установлено, что для полного ингибирования активности N115A и D113A необходима на порядок большая концентрация ЭДТА, чем для EndoT5 и мутантов N115D и S117A. Также мы изучали влияние катионов Ca^{2+} на восстановление ферментативной активности после ингибирования: активность EndoT5, мутантов N115D и S117A после ингибирования восстанавливается полностью, а N115A и D113A - на 20 - 30%.

Мы предполагаем, что регуляторная роль Ca^{2+} заключается в стабилизации структуры подвижной петли фермента, в состав которой входят исследованные нами полярные аминокислоты. Различия между нативным белком EndoT5 и полученными мутантными белками мы связываем с изменениями динамики длинной кальций-связывающей петли в результате мутагенеза.