

Исследование роли консервативного триптофана-114 эндолизина бактериофага T5 с помощью сайт-направленного мутагенеза

Ситникова Дарья Станиславовна

Студент (бакалавр)

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

E-mail: darya_sitnikova_2000@mail.ru

Эндолизинами называют ферментативные компоненты литических белковых систем бактериофагов, отвечающие за основной этап деструкции клеточной стенки бактерии - разрушение слоя пептидогликана. Эти ферменты специфичны к гидролизуемой связи, например, эндолизин сифовируса T5 (EndoT5) является l-аланоил-d-глутаматпептидазой.

Эндолизины фагов, инфицирующих грамположительные бактерии, обладают доменной структурой: каталитический домен отвечает за акт гидролиза, а связывающий - за взаимодействие с клеточной стенкой. Однако, эндолизины фагов, чьими хозяевами являются грамотрицательные бактерии, - как правило, небольшие глобулярные белки, единственный домен которых совмещает функции катализа и связывания субстрата.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей и пространственных структур целого ряда ортологичных эндолизинов выявил консервативный триптофан вблизи активного центра, положение и гидрофобный характер которого предполагают его ключевую функцию в процессе связывания пептидогликана. Целью нашей работы является исследование роли этого остатка в катализе, связывании субстрата и формировании структуры белковой глобулы на примере хорошо изученной нами пептидазы колибактериофага T5.

С помощью сайт-направленного мутагенеза была осуществлена точечная замена W114 на аланин. Продукцию мутантного белка вели в клетках штамма *E. coli* C41(DE3), фермент очищали хроматографическими методами с помощью ионообменных колонок до электрофоретической гомогенности. Полученный рекомбинантный белок был полностью растворим и имел глобулярную структуру, свойственную нативному белку.

Спектрофотометрический анализ удельной литической активности показал, что мутант EndoT5W114A ее лишен: несмотря на сохранность активного центра, фермент не способен осуществлять катализ. Сравнительный анализ влияния различных аминокислотных замен на связывание субстрата вели, измеряя скорость гидролиза стандартного субстрата в смеси нативного EndoT5 и мутанта. Было показано, что даже в 1000-кратном молярном избытке EndoT5W114A слабо влияет на скорость гидролиза природным ферментом. Этим EndoT5W114A резко отличается от мутанта по каталитическому остатку аспарагиновой кислоты EndoT5D130A, который, также будучи неактивным, сохраняет способность связывать субстрат, конкурентно ингибируя природный фермент в смеси. Отрицательным контролем в эксперименте служил бычий сывороточный альбумин в таком же молярном избытке.

Таким образом, есть основания полагать, что основная функция консервативного триптофана-114 заключается в связывании субстрата, опосредующего акт собственно гидролиза, осуществляемого однодоменным эндолизином бактериофага T5.