

УДК 577.214.622+577.27+615.37

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДЫ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ ИЗ ПРОКАРИОТ

© 2020 г. Н. Н. Мордкович¹, А. Н. Антипов¹, Н. А. Огорокова¹,
Т. Н. Сафонова¹, К. М. Поляков², В. П. Вейко¹, *

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 11907 Россия

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия
*e-mail: vladveiko@yahoo.com

Поступила в редакцию 09.06.2020 г.

После доработки 26.06.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

На основе клеток *Escherichia coli* сконструирована библиотека штаммов-продуцентов рекомбинантных нуклеозидфосфорилaz (NP), их мутантных и гибридных форм из различных мезофильных и экстремофильных микроорганизмов. Показано, что субстраты стабилизируют структуру NP при воздействии температуры, при этом именно неорганический фосфат-ион является решающим в этом процессе. С использованием биоинформатических методов анализа сделано предположение, что N-концевая структура белков во многом определяет термостабильность NP. Сконструирован гибридный белок тимидинфосфорилazы (TRP) из *E. coli*, в котором N-концевой фрагмент (1-62 а. о.) заменен на соответствующий фрагмент TRP из термофильной бактерии *Geobacillus stearothermophilus*, показано, что термостабильность полученной гибридной формы TRP повысилась. В первичной структуре уридинфосфорилazы (UDP) из *E. coli* выявлена высококонсервативная аминокислотная последовательность 25-Pro-Gly-Asp-Pro-30 для этих ферментов из мезофильных микроорганизмов. Сконструирована мутантная форма (Asp27Gly) UDP из *E. coli*, которая также характеризовалась повышенной термостабильностью по сравнению с исходной формой. Сделано предположение, что именно архитектура строения фосфат-связывающего сайта у UDP и особенности его функционирования, имеют решающее значение в придании этому ферменту термостабильности.

Ключевые слова: нуклеозидфосфорилazа, сайт-направленный мутагенез, термостабильность

DOI: 10.31857/S0555109920060124

Нуклеозидфосфорилazы (NP) – ферменты катаболизма нуклеозидов, катализирующие обратимый фосфорилиз нуклеозидов до рибозо(дезоксирибозо)-1-фосфата и соответствующего гетероциклического основания. Они присутствуют в клетках практически всех организмов, к ним могут быть отнесены: тимидинфосфорилazа (КФ2.4.2.4, TRP), пуридинфосфорилazа (КФ2.4.2.1, PuNP), уридинфосфорилazа (КФ2.4.2.3, UDP) и др. Выяснено, что NP принимают активное участие в формировании и развитии патологических процессов в клетках млекопитающих (ревматоидный артрит, системная склеродермия, подагра, остеоартроз, онкология и т.д.) [1–3]. Так, для TRP и UDP показано резкое возрастание активности этих ферментов в раковых клетках, что привело к созданию диагностического метода определения трансформированных (раковых) клеток. Обнаружено, что TRP и UDP не только разрушают терапевтические агенты нуклеозидной природы, понижая их потенциал, но также способствуют ангиогенезу

незу опухоли и являются антиапоптотическими факторами. Все вышеуказанные факты переводят NP в разряд мишеней для терапевтического воздействия с целью регуляции или ингибирования их активности [4, 5].

NP нашли применение в ферментативном синтезе (“зеленая химия”) [6] производных нуклеозидов, применяемых в практической медицине в качестве противоопухолевых, противовирусных и противопаразитарных агентов. Было показано, что эти ферменты могут быть успешно использованы для синтеза рибозо(дезоксирибозо)-1-фосфата, как важного исходного интермедиата для проведения энзиматического синтеза модифицированных нуклеозидов [7]. При этом для повышения эффективности их ферментативного синтеза важно проведение всего процесса при повышенных температурах, так как растворимость многих гетероциклических соединений, участвующих в синтезе, недостаточно высокая.

Таблица 1. Олигодезоксирибонуклеотиды, использованные при конструировании гена гибридной формы ТРР (*G. stearothermophilus* – *E. coli*) и амплификации структурной части гена ТРР из *G. stearothermophilus* (GeneBank CP016552.1)

Наименование праймера	Структура олигодезоксирибонуклеотидов 5' → 3'	Наименование белка
11С	GCGCTGACGATGGCGATGCGAGATTCAGGAACCGTTCTC	Hyb111
11N	GAGAACGGTTCCTGAATCTCGCATCGCCATCGTCAGCGC	
CPYRgs*	ATCGCCAAGCTTCCCTTACTATACGATGGT	ТРР
NPYRgs	AAAAAGGATCCC GCGATGCGAATGG	

* В структуру олигонуклеотида CPYRgs для обеспечения более эффективной терминации трансляции в клетках *E. coli* введены дополнительные кодоны tta и ста (выделены жирным шрифтом).

Для реализации возможности практического использования NP необходимы углубленные знания об их строении и механизме функционирования, включая принципы формирования термостабильных вариантов этих белков.

Цель работы – изучение рекомбинантных NP, их гибридных и мутантных форм, оценка вклада отдельных фрагментов и а.о. полипептидной цепи в формирование термостабильных вариантов ферментов.

МЕТОДИКА

В работе использовали: трис-основание (трис-ОН), трис-гидрохлорид (трис-НСl), агарозу (Type I, Low EEO), ДДС-Na, борную кислоту, ЭДТА – (“Sigma”, США), бромистый этидий, персульфат аммония, N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин – “Fluka” (Швейцария), акриламид, N,N'-метилен-бис-акриламид (“Serva”, Германия), триптон “Bacto”, агар “Bacto”, дрожжевой экстракт “Bacto” (“Difco”, США), ампициллин (“Appli-Chem”, Германия), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (“MBI Fermentas”, Литва). Неорганические соли – фирмы “Merck” (Германия), реактивы квалификации х. ч. и о. с. ч. (Россия). Белковые маркеры молекулярной массы – “Unstained Protein Molecular Weight Marker” фирмы “MBI Fermentas” (Литва).

Taq-полимеразу, рестрицирующие эндонуклеазы (BamHI и HindIII) и ДНК-лигазу фага T4 производства “MBI Fermentas” (Литва) использовали в соответствии с рекомендациями фирм-производителей.

Выделение ДНК, очистку, гидролиз эндонуклеазами рестрикции, лигирование фрагментов ДНК, а также трансформацию клеток *E. coli* плазмидами проводили согласно [8].

Штаммы *E. coli* JM110 и C600ΔudpRecA- (*thi thrB leuB lacY supE tonA recA Tn10*) предоставлены Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов (НИЦ “Курчатовский институт”-ГосНИИгенетика”, Россия).

Источниками рекомбинантных ТРР и UDP служили полученные нами ранее штаммы-продуценты этих ферментов *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Halomonas chromatireducens*, *Shewanella oneidensis* –MR-1 [9–13].

При конструировании экспрессионных плазмид в качестве реципиентного использовали сконструированный ранее бактериальный вектор pUU18 [14], содержащий в своем составе промотор-операторную область гена UDP из *E. coli*.

Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе “Eppendorf Mastercycler gradient” (“Eppendorf”, Германия).

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов и секвенс ДНК проводился фирмой “Синтол” (www.syntol.ru) на коммерческой основе.

Ген гибридного белка (Hyb111) конструировали методом ПЦР аналогично ранее опубликованной работе [15]. Структуры использованных в работе олигодезоксирибонуклеотидов приведены в табл. 1. В качестве матрицы при амплификации структурной части гена ТРР из *Geobacillus stearothermophilus* использовали ДНК самого микроорганизма, а при конструировании Hyb111 – плазмиду, полученную в работе [9].

Выделение плазмид проводили с использованием набора “GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit” (“MBI Fermentas”, Литва). Клетки *E. coli*, содержащие плазмиду, культивировали в течение 16–18 ч в стеклянных пробирках (или колбах) со средой LB (ампициллин – 150 мкг/мл) при 37°C и 250 об./мин в шейкере-инкубаторе “Excella E25” (“New Brunswick Scientific”, США).

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [16] с окраской реагентом “Bio-Rad Protein Assay” (“Bio-Rad”, США). В качестве стандарта использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (“Sigma”, США).

Электрофоретическое разделение белков проводили по Леммли [17].

Ферментативную активность рекомбинантных NP и их гибридных и мутантных форм определяли в K-фосфатном буфере согласно [9, 18].

Термостабильность белков определяли согласно [19]. Раствор исследуемого белка выдерживали в буфере (20 mM трис-HCl, pH 8.0) при выбранной температуре в течение запланированного времени. Затем пробу этого белка переносили в заранее прогретый до 40°C раствор соответствующих субстратов (5 mM тимидин или 5 mM уридин в 20 mM K-фосфатном буфере, pH 7.4) и инкубировали в течение 5 мин, после чего спектрофотометрически определяли остаточную активность фермента [9, 18]. Температуру инкубации раствора белка при определении термостабильности фермента задавали на 5–10°C ниже значения $T_{\text{опт}}$.

Четвертичную структуру рекомбинантных NP подтверждали методом аналитической гель-фильтрации на колонке Tricorn 10/300 с сорбентом Superdex 200 с использованием прибора АКТА FPLC ("GE Healthcare", Великобритания) в 10 mM Na-фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 150 mM NaCl. Регистрацию осуществляли при длине волны 280 нм. Объем образца – 100 мкл, скорость элюции – 1 мл/мин. В качестве белков-маркеров использовали набор "Gel Filtration Calibration Kits" ("GE Healthcare Life Sciences", Великобритания), а также рекомбинантные тимидин- и уридинфосфорилазы из *E. coli*.

Выделение и очистку рекомбинантных NP и их мутантных форм проводили, как описано нами ранее для UDP [11].

Первичную структуру выделенных рекомбинантных белков подтверждали методом MALDI-TOF/масс-спектрометрического анализа их триптических гидролизатов.

Статистическую обработку результатов серии измерений проводили с использованием программы StatPlus2007 (<http://analystsoft.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В научной литературе широко обсуждается вопрос природы термостабильности белков из различных микроорганизмов (психрофилы, археи, мезофилы, термофилы) [20–26]. Однако приведенные в работах [21, 26] данные сравнительного анализа термостабильности белков из мезо- и термофильных микроорганизмов показывают, что ни показатель плотности упаковки белков, ни сравнительный структурный анализ, ни величина температурного оптимума NP не позволяли отнести эти ферменты к термостабильным или термолабильным. Более того, в ряде случаев, у авторов существуют определенные разногласия при экспериментальном определении этих параметров для аналогичных ферментов [27]. Поэтому определение свойств белков-аналогов, желательно

проводить в условиях не только одной лаборатории, но и с использованием одинаковых реагентов и аппаратного оформления.

К настоящему времени NP из различных организмов (в том числе и термофильных) выделены и достаточно хорошо охарактеризованы. Учитывая, что эти белки хорошо кристаллизуются, для многих из них изучена пространственная организация. Наличие такого большого объема информации о свойствах и структурах этого класса ферментов, казалось бы, может способствовать эффективному решению вопроса об основных принципах формирования термостабильных белков и, в частности, NP. Однако попытки целенаправленно исследовать функциональную роль как фрагментов первичной структуры, так и отдельных а. о. в придании NP термостабильных свойств, не приводили к успеху при объяснении проявления термотолерантности этих ферментов. Среди этих публикаций можно выделить только несколько работ [28, 29].

В литературе на основе анализа множества белков-аналогов из термофильных и мезофильных организмов обнаружено, что они имели аналогичную третичную упаковку. Было показано, что эти белки не организуют в своем составе вторичных или третичных структур, которые можно было бы рассматривать как определяющие в формировании термостабильных белковых молекул. Высказывалось предположение, что именно электростатические взаимодействия заряженных а. о., наряду с водородными связями, являются основным регулятором термотолерантности белков. Кроме того, отмечается, что термостабильные белки как правило не содержат в своей структуре гидрофобных а. о. [26].

Одним из направлений исследования термостабильности белков стало предсказание этого параметра с применением биоинформатических подходов [30–34]. Следует признать, что, несмотря на предпринятые усилия, программное обеспечение еще далеко от совершенства и не дает четкой возможности предсказать термостабильность белков в целом, а также прогнозировать этот параметр при планировании точечных изменений в первичной структуре полипептидов. Причиной этого может являться многофакторность изменений свойств белков и невыясненная до конца природа фолдинга, как самих белков, так и их мутантных форм. Наиболее полно состояние этой проблемы отражено в работах [30, 35], где авторы высказывают пессимистичное мнение что, "несмотря на общий характер супермедленно-разворачивания белков, эволюция может использовать (и использует) все, что направлено на стабилизацию белковой молекулы, и поэтому мы никогда не найдем всеобъемлющее химическое, биофизическое и энергетическое объяснение ги-

Таблица 2. Исследование термостабильности NP и их мутантных форм*

Белок	T_m , °C		Время полуинактивации фермента, мин (°C)	Источник
	предск.	экспер.		
UDP				
<i>E. coli</i> wt	55–65	55 ± 3	340 ± 4 (50)	[10]
<i>E. coli</i> (D27G)	>65	40 ± 2	Потеря активности 15 ± 5%, 1440, (40)	[15]
<i>S. oneidensis</i> MR-1 wt	55–65	60 ± 4	240 ± 3 (50)	[11]
<i>K. aerogenes</i> wt	55–65	70 ± 2	125 ± 2 (50)	[12]
<i>S. typhimurium</i> wt	>65	70 ± 3	1400 ± 3 (60)	[12]
ES1 (гибрид <i>E. coli</i> – <i>S. typhimurium</i>)	55–65	60 ± 2	800 ± 4 (50)	[15]
<i>S. oneidensis</i> (T91S)	55–65	60 ± 1	Потеря активности – 10 ± 5% за 480 мин (50)	[36]
TRP				
<i>E. coli</i> wt	55–65	53 ± 2	12 ± 3	[9]
<i>G. stearothermophilus</i> wt	>65	80 ± 3	Потеря активности 10 ± 4% за 1420 мин (60)	Данная работа
Hyb111(гибрид TRP <i>E. coli</i> – <i>G. stearothermophilus</i>)	55–65	60 ± 3	53 ± 2 (50)	Данная работа
<i>H. chromatireducens</i> wt	>65	60 ± 1	40 ± 3 (50)	[13]

* wt – рекомбинантный белок из штамма дикого типа. Искусственно внесенные замены в первичную структуру белков указаны в скобках в однобуквенном обозначении а. о.

пертермостабильности белка”. С этими выводами практически согласны и авторы обзора [20], в котором рассмотрены предполагаемые принципы формирования термостабильных белков у архей и эубактерий.

Настоящее исследование, направленное на изучение термостабильности одного класса белков – NP, несущих искусственно введенные точечные и протяженные (гибридные белки) замены в первичной структуре ферментов, может дать дополнительную информацию к дальнейшему построению биоинформационных технологий при решении фундаментальной проблемы – выяснению принципов формирования устойчивых к термической денатурации белков.

Ранее на основе клеток *E. coli* нами была сконструирована серия штаммов-продуцентов рекомбинантных NP и их мутантных форм из различных мезофильных и экстремофильного микроорганизмов (*E. coli*, *K. aerogenes*, *S. typhimurium*, *S. oneidensis* MR-1, *H. chromatireducens* AGD 8-3), что позволило создать “библиотеку” этих белков (табл. 2).

В данной библиотеке в качестве своеобразного контроля отсутствовала NP из термофильного микроорганизма. На первом этапе нами были предприняты эксперименты по конструированию штамма-продуцента такой рекомбинантной NP из термофильного микроорганизма. В каче-

стве источника гена термостабильной TRP был выбран штамм *Geobacillus stearothermophilus* (GeneBank CP016552.1). Амплификацию гена TRP из этого микроорганизма проводили с использованием праймеров CPYRgs и NPYRgs (табл. 1) аналогично описанному в работе [11]. После проведения амплификации целевой фрагмент ДНК (1336 п. о.) был выделен и клонирован по сайтам *Vam*HI и *Hind*III в составе экспрессионного вектора pUU18 под контроль промотор-операторной области гена UDP из *E. coli*. Соответствие нуклеотидной последовательности клонированного фрагмента запланированной подтверждали секвенированием. Сконструированный рекомбинантный экспрессионный вектор (рис. 1) был обозначен как pTRP(Gb). Экспрессионной плазмидой pTRP(Gb) трансформировали клетки штамма *E. coli* C600Δ*uidr* и анализировали уровень накопления целевого рекомбинантного белка. Полученные результаты (рис. 2) свидетельствовали о том, что TRP из *G. stearothermophilus* накапливался в растворимой фракции клеток штамма-продуцента. Следовательно, промотор-операторная область гена *udp* из *E. coli* способна осуществлять высокоэффективную транскрипцию гибридного гена TRP (*deoA*) из данного термофильного микроорганизма в условиях гетерологичной экспрессии. Рекомбинантный белок был выделен и показано, что он осуществлял обратимый фосфоролит дезоксити-

мидина, то есть обладал целевой ферментативной активностью.

Все рекомбинантные NP (табл. 2), исследованные в данной работе, были очищены ионообменной хроматографией и проявляли специфическую активность. Первичная структура белков была определена как сиквенсом соответствующих генов, так и MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометрическим анализом их триптических гидролизатов. Методом аналитической гель-фильтрации была также подтверждена четвертичная структура выделенных нативных ферментов, их мутантных и гибридных форм: гексамерная для UDP и димерная для TPP.

Для корректного исследования устойчивости данных белков к тепловой денатурации необходимо было, прежде всего, определить условия проведения данных экспериментов. При этом цель достигнуть полной денатурации белков не ставилась, а в качестве показателя нарушения структуры изучаемых белков был выбран основной показатель — изменение или потеря ферментативной активности NP, имеющий не только теоретический, но и практический смысл [6, 37]. На начальном этапе исследования термальной стабильности изучаемых белков было важно определить влияние на фермент стабилизирующих факторов, в частности субстратов. Следует отметить, что степень этого влияния может зависеть не только от вида субстрата, но и структуры изучаемого белка, то есть, данный фактор не относится к числу предсказуемых и мог вносить существенный вклад в трактовку получаемых данных. В связи с этим были проведены предварительные эксперименты по выявлению стабилизирующего действия субстратов. Исследование проводили с использованием рекомбинантной TPP из *E. coli*. Эксперименты проводили в реакционной смеси, следующего состава: 5 мМ тимидин и 10 мМ фосфат-ион, 50°C. Полученные результаты (рис. 3а) показали, что Pi в концентрации 10 мМ, действительно, оказывал существенное стабилизирующее действие на рекомбинантный фермент. Для подтверждения этого факта было проведено исследование влияния концентрации (дозозависимость) Pi на термальную стабильность TPP (рис. 3б). Выявленный эффект стабилизации NP субстратами, определил тактику постановки исследования термостабильности изучаемых ферментов (см. раздел Методика).

Важно также отметить, что в данной работе были выявлены оптимальные температуры проявления ферментативной активности ($T_{\text{опт}}$) для каждого из исследуемых белков (табл. 2). Этот параметр был важен для определения температуры инкубации раствора белков при исследовании термотолерантности NP (значение температуры понижали на 5–10°C от значения $T_{\text{опт}}$). При определении значения $T_{\text{опт}}$ для анализа предска-

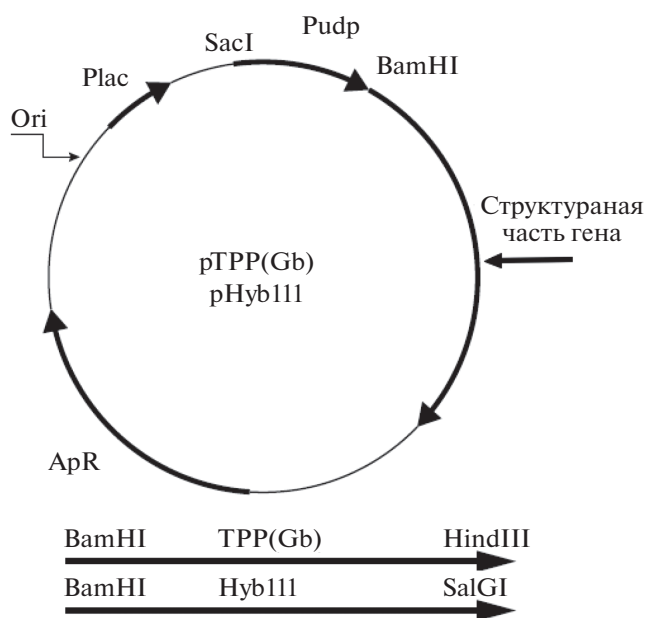


Рис. 1. Общая схема экспрессионных векторов, полученных в работе. Структурные части генов (TPP(Gb) или Hyb111) находятся под контролем промотор-операторной части (Pudp) гена UDP из *E. coli*.

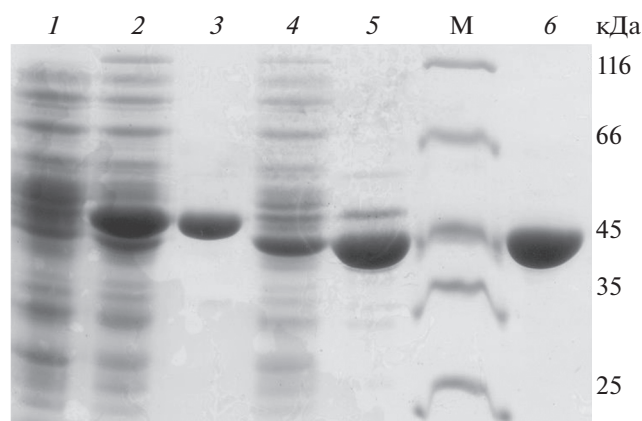


Рис. 2 Электрофоретический анализ рекомбинантных белков в клетках *E. coli* S600Δudp в 12.5%-ном ПААГ с ДСН-Na. М — маркеры молекулярной массы белков; 1, 2, 4 — белки растворимых фракций штамма-реципиента и штаммов-продуцентов, полученные после разрушения ультразвуком клеток *E. coli*; 3, 5, 6 — очищенные рекомбинантные ферменты: TPP из *G. stearothermophilus*, гибридный белок Hyb111 и TPP из *E. coli* соответственно.

зательного потенциала программы Tm Predictor (www.tm.life.nthu.edu.tw) был проведен теоретический расчет температур плавления исследуемых белков. Результаты сравнения экспериментальных и предсказанных T_m в целом показали хорошее совпадение (табл. 2) этих величин не только для нативных белков, но и их мутантных форм, хотя программа T_m Predictor и дает доволь-

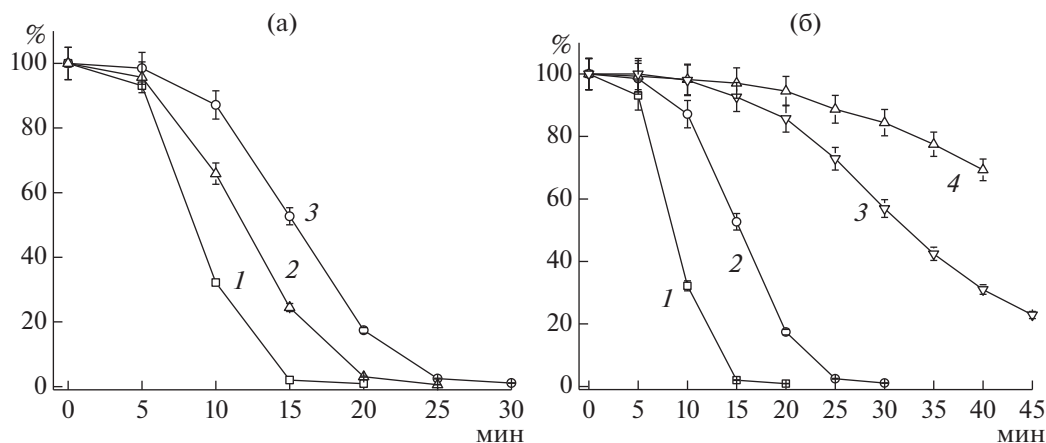


Рис. 3. Влияние субстратов на термостабильность ТТР из *E. coli*: а – 1 – без субстрата, 2 – 5 мМ тимидин, 3 – 10 мМ фосфат; б: 1 – без субстрата, 2 – 10 мМ фосфат, 3 – 20 мМ фосфат, 4 – 40 мМ фосфат. Фермент инкубировали при температуре 50°C.

но широкое значение этого параметра по сравнению с экспериментально выявленными. В случае же мутантного белка UDP (Asp27Gly) из *E. coli*, предсказанная величина T_m значительно отличалась от экспериментальной $T_{\text{опт}}$.

Обращает на себя внимание характер графиков при определении $T_{\text{опт}}$ для исследуемых ферментов. На рис. 4 приведено типичное изменение ферментативной активности под воздействием температуры при экспериментальном анализе $T_{\text{опт}}$ для термостабильной ТТР из *G. stearothermophilus* и ее аналога из мезофильного микроорганизма (*E. coli*).

Из рис. 4 видно, что после достижения $T_{\text{опт}}$ ферментативная активность термолабильной ТТР из *H. chromatireducens* резко снижалась, в то время как аналогичный показатель у ТТР из *G. stearothermophilus* снижался более плавно. Вероятно, характер кривой может быть объяснен тем, что изучаемые белки формируют активную форму в мультимерном комплексе, поэтому даже частичная диссоциация на субъединицы под воздействием температуры может приводить к относительно резкому

снижению ферментативной активности. Кроме того, денатурация, вероятно, носит кооперативный характер, что и приводит к резкому падению ферментативной активности у ТТР из *H. chromatireducens*.

Из полученных нами экспериментальных результатов (табл. 2) можно сделать предварительный вывод о том, что само значение температурного оптимума не указывало на термостабильность белковой молекулы у НР в целом, но характер изменения активности при температурном воздействии может служить, по крайней мере, предварительной оценкой термостабильности для этого класса ферментов. Во многом этот факт отмечен и в работе [38]. Исследование термостабильности ТТР из *G. stearothermophilus* (рис. 5), действительно показало, что этот показатель значительно превышал таковой для аналогичного белка из экстремофильного галофильного микроорганизма *H. chromatireducens*.

В литературе описано исследование, направленное на получение термостабильной формы UDP из *E. coli* методом насыщающего итеративного мутагенеза [28]. Было получено две мутантных формы этого белка UPL7 (Met38Val, Lys40Asp, Lys235Arg, Gln236Ala) и UPL8 (Lys235Arg, Gln236Ala), проявлявших повышенную, по сравнению с исходным ферментом, термостабильность. Авторы статьи объяснили влияние замен в мутанте UPL8 тем, что эти а.о. входят в состав спирального участка, сближенного с N-концом белка и сделали предположение, что указанные мутации стабилизируют весь этот район белковой молекулы, тем самым, осуществляя термостабилизацию фермента в целом. Таким образом, вторичная и третичная структуры этого домена (взаимодействие N- и C-концевых а.о. в структуре НР) во многом могут определять как активность самого фермента, так и, предположительно, его термостабильность.

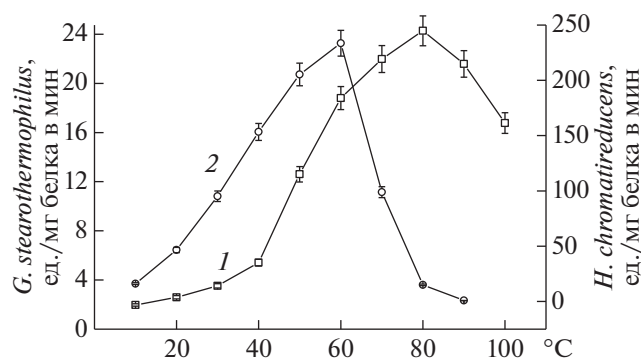


Рис. 4. Влияние температуры на активность ТТР из *G. stearothermophilus* (1) и *H. chromatireducens* (2).

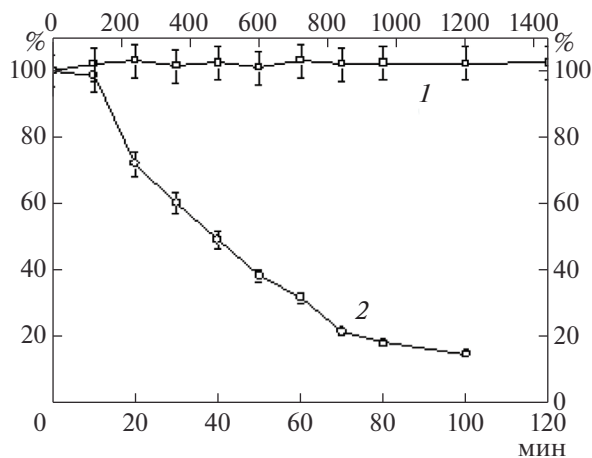


Рис. 5. Термостабильность TPP из *G. stearothermophilus* (1) при 60°C и из *H. chromatireducens* (2) при 50°C. Нижняя временная шкала для фермента 2, верхняя — для фермента 1.

Анализ роли N-концевых а. о. в функционировании UDP, проведенный нами ранее с использованием сайт-направленного мутагенеза показал, что этот участок важен для формирования активной молекулы белка. Были исследованы также ферментативные свойства нативных, мутантных и гибридных (несущих протяженные замены в составе первичной структуры) NP [9–13, 15, 36]. В частности, было показано [15], что замещение N-концевого фрагмента (1–43 а. о.) в UDP из *E. coli* на аналогичный участок UDP из *S. typhimurium* приводило к увеличению ферментативной активности исходного белка. В работе [39] на основе рентгеноструктурного анализа обнаружено, что в гексамере UDP из *E. coli* присутствуют

ионы калия, которые попарно координируют именно N-концевые а. о. (I69, E49 и S73) в соседних субъединицах этого фермента. Аналогичная координация а.о. ионами калия была выявлена и у TPP [40]. Важность именно этой координации в проявлении ферментативной активности белка нами была подтверждена при исследовании свойств мутантной (C212S) формы фермента из *S. oneidensis* MR-1 [41]: ферментативная активность мутантной формы белка была в 5.5 раз выше при использовании К-фосфатного буфера по сравнению с Na-фосфатным. Аналогичные результаты повышения ферментативной активности были отмечены нами при исследовании других мутантных форм UDP из *S. oneidensis* MR-1 [36].

Вышеприведенные факты указывали на важность именно этого участка первичной структуры белка и предопределили проведение исследования, направленного на выяснение роли N-концевых а. о. в проявлении термоустойчивости NP. С этой целью нами был сконструирован ген гибридного белка (Hyb111), в котором фрагмент из 62 а. о. первичной структуры TPP из *E. coli* заменены на соответствующий фрагмент TPP из *G. stearothermophilus*.

Конструирование гена гибридного белка проводили как описано в [15] с использованием праймеров 11N и 11C (табл. 1). Общая структура экспрессионного вектора приведена на рис. 1, а схематическое представление структуры гибридного белка дана на рис. 6. Уровень накопления рекомбинантного белка Hyb111 при гетерологичной экспрессии его гена в клетках *E. coli* и гомогенность выделенного фермента показаны на рис. 2.

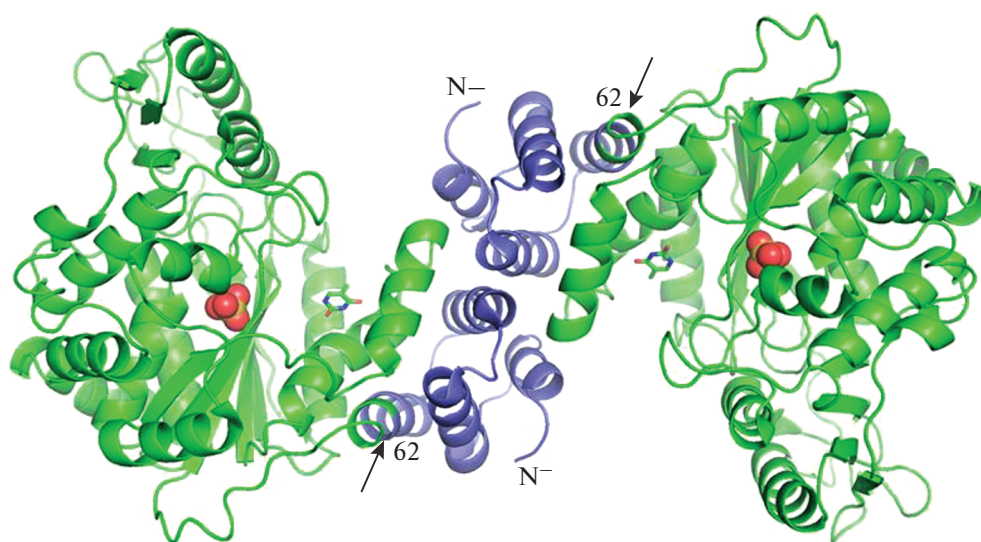


Рис. 6. Структура гибридной (Hyb111) молекулы TPP. Полипептид TPP из *E. coli* выделен зеленым цветом, фрагмент (1–62 а. о.) TPP из *G. stearothermophilus* — синим. Стрелками указан переход первичных структур в гибридном белке. Построено на основе PDB ID 4EAF с использованием программы PyMol (www.pymol.org).

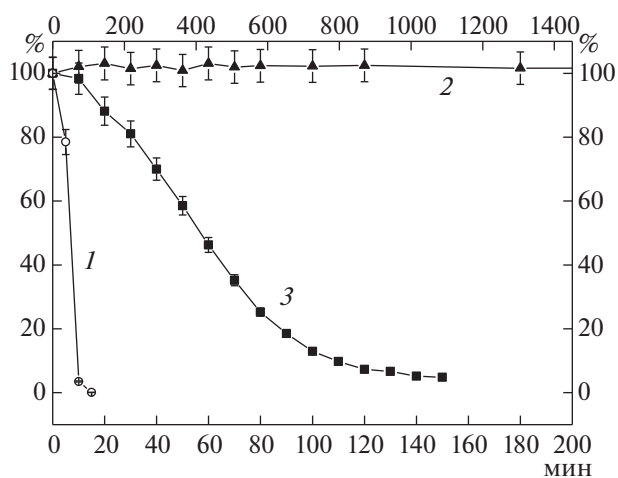


Рис. 7. Термостабильность ТРР (в % от исходной активности) из *E. coli* (1) при 50°C, *G. stearothermophilus* (2) при 60°C и гибридная молекула Hyb111 (3) при 50°C. Нижняя временная шкала для ферментов 1 и 3, верхняя – для фермента 2.

Исследование термостабильности гибридного белка Hyb111 показало (рис. 7, табл. 2), что введенная в N-концевую часть первичной структуры ТРР из *E. coli* протяженная замена (1–62 а. о.) на фрагмент аналогичного белка из *G. stearothermo-*

philus, действительно, повышала толерантность НР к температурному воздействию. Более того, исследование гибридного белка ES1 (гибрид *E. coli*–*S. typhimurium*) [15], также показало существенное увеличение термостабильности гибридного белка (табл. 2). В работе [36] было доказано, что именно эффективность связывания P_i является решающим и, во многом, лимитирующим фактором в проявлении активности у НР.

В литературе также описано [28] успешное применение искусственного эволюционного мутагенеза UDP из *E. coli* для получения ее термостабильной формы.

Анализ особенностей пространственной структуры UDP из *E. coli* и ее мутантных форм, а также результатов для других НР, в табл. 2, позволил предположить, что именно архитектура фосфат-связывающего сайта у НР может во многом определять термостабильность этого класса ферментов. Действительно, полученная в работе [28] термостабильная форма UDP из *E. coli* (рис. 8), несет замены (Lys235Arg, Gln236Ala), которые расположены на N-конце альфа-спирального участка (Met234 – Leu253) и пространственно сближены с участком связывания P_i (рис. 8). Именно в этом же районе белковой молекулы находится и проведенная нами замена Asp27Gly. Следует отметить,

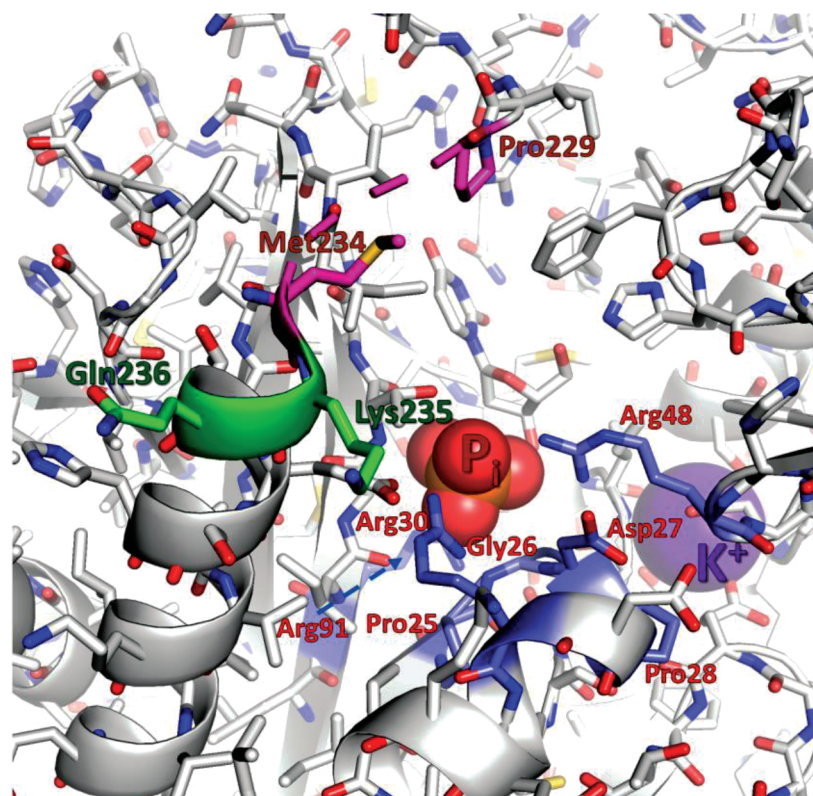


Рис. 8. Элемент третичной структуры мономера UDP из *E. coli* (PDB ID 1RXS) и расположение а. о., подвергавшихся мутагенезу в работах [15, 28]. Построение проводили с использованием программы PyMol (www.pymol.org). P_i – ион неорганического фосфата, K^+ – ион калия. Петля: Pro229 – Met234, альфа-спираль: Met234 – Leu253.

что а. о. Asp27 находится в окружении Pro25 и Pro28, которые могут создавать жесткие конформационные ограничения для пространственной ориентации боковой цепи этого остатка. Важная роль остатка Asp27, как и всей архитектуры именно этого фрагмента в связывании Pi, подтверждается и резким повышением K_m для фосфат-иона у данной мутантной формы белка [15]. Аналогичные данные по уменьшению значения K_m для Pi отмечались нами ранее и для других мутантных форм UDP при изучении особенностей функционирования фосфат-связывающей области у этого фермента из различных микроорганизмов [36]. Совокупность данных, приведенных в табл. 2 и результаты работы [36] позволяют предположить, что уменьшение сродства мутантных белков к Pi сопровождалось повышением термостабильности NP. Одной из структурных особенностей формирования фосфат-связывающего сайта у NP являются малоструктурированные участки первичной структуры этих белков. Эти участки характерны для всех NP, например, у UDP из *S. oneidensis* MR1 один из таких фрагментов представлен 226–236 а. о. [41] и принимает участие в формировании “открытой” и “закрытой” конформаций белка. Термодинамическая подвижность такой петлевой структуры может во многом нарушать элемент третичной структуры белковой молекулы и, как следствие, приводить к потере эффективности связывания белком Pi, потере ферментативной активности белка и, в конечном итоге, инактивации фермента. Анализ фрагмента третичной структуры UDP из *E. coli* показал, что максимально термостабильная форма этого белка, полученная в работе [28], несет мутации Lys235Arg, Gln236Ala (рис. 8), которые находятся в непосредственной близости к малоструктурированному участку Met234 – Pro229. Этот факт позволил предположить, что внесенные замены могут приводить к существенному уменьшению подвижности указанной петли и стабилизировать как ее, так всю молекулу UDP.

К настоящему времени для мутантной (UDP, *E. coli*, Asp27Gly) и гибридной (ES1, *E. coli*–*S. typhimurium*) NP, получены кристаллические формы и проводится рентгеноструктурный анализ их вторичной, третичной и четвертичной структур.

Таким образом, на основании исследования сформированной библиотеки природных и мутантных форм NP получены новые данные о механизме стабилизации белка у этого класса ферментов при температурном воздействии. Сделано предположение об определяющей роли архитектуры фосфат-связывающей области этих белков в приобретении ими термостабильности. Определена роль как отдельных аминокислотных остатков, так и фрагментов полипептидной цепи NP в придании этим ферментам термотолерантности.

Важную роль в термальной дестабилизации NP могут играть также малоструктурированные петлевые участки вторичной и третичной структуры, роль которых предполагается выяснить в последующем исследовании.

При проведении исследований использовали оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук.

Исследование выполнено при частичной поддержке РФФИ (Грант № 18-04-00784А).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Liekens S, De Clercq E, Neyts J.* //Biochem. Pharmacol. 2001. V. 61. № 3. P. 253–270.
2. *Carmeliet P.* //Nature. 2005. V. 438. № 7070. 932–936.
3. *Furukawa T, Tabata S, Yamamoto M, Kawahara K, Shinsato Y, Minami K, Shimokawa M, Akiyama S.* // Pharmacological Research. 2018. V. 132. P. 15–20.
4. *Bera H., Chigurupati S.* //Eur. J. Med. Chem. 2016. V. 124. P. 992–1003.
5. *Wei Li, HongYue* // Trend. Card. Med. 2018. V. 28. № 3. P. 157–171.
6. *Михайлопуло И.А., Мирошников А.И.* // Acta naturae. 2010. T. 2 № 2. С. 38–61.
7. *Kulikova I.V., Drenichev M.S., Solyev P.N., Alexeev C.S., Mikhailov S.N.* // Eur. J. Org. Chem. 2019. V. 2019. № 41. P. 6999–7004.
8. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* Molecular Cloning: a Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 545 p.
9. *Вейко В.П., Супрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Андриюхина Р.В., Дебабов В.Г.* // Биотехнология. 1994. № 4. С. 2–4.
10. *Вейко В.П., Супрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Миронов А.А., Андриюхина Р.В., Дебабов В.Г.* // Докл. Акад. наук. 1994. Т. 339. № 6. С. 819–821.
11. *Мордкович Н.Н., Мануверва В.А., Вейко В.П., Дебабов В.Г.* // Биотехнология. 2012. № 1. С. 21–30.
12. *Вейко В.П., Чеботаев Д.А., Овчарова И.В., Гулько Л.Б.* // Биоорг. химия. 1998. Т. 24. № 5. С. 381–387.
13. *Антипов А.Н., Мордкович Н.Н., Хижняк Т.В., Окрокова Н.А., Вейко В.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 1. С. 1–7.
14. *Вейко В.П., Осипов А.С., Шехтер И.И., Буленков М.Т., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Чибискова Н.А., Эррайс Л.Л., Деревщикова Е.Б., Дебабов В.Г.* // Биоорг. химия. 1995. Т. 21. № 5. С. 354–358.
15. *Чеботаев Д.В., Гулько Л.Б., Вейко В.П.* // Биоорг. химия. 2001. Т. 27. № 3. С. 184–190.
16. *Bradford M.M.* // Anal. Biochem. 1976. V. 2. P. 248–254.
17. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.

18. *Leer J.C., Hammer-Jespersen K., Schwartz M.* // Eur. J. Biochem. 1977. V. 75. № 1. P. 217–24.
19. *Cacciapuoti G., Bertoldo C., Brio A., Zappia V., Porcelli M.* // Extremophiles. 2003. V. 7. P. 159–168.
20. *Trivedi S., Gehlot H.S., Rao S.R.* // Gen. Mol. Res. 2006. V.5. № 4. P. 816–827.
21. *Gianese G., Bossa F., Pascarella S.* // Proteins. 2002. V. 47. P. 236–249.
22. *Vieille C., Zeikus G.J.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2001. V. 65. P. 1–43.
23. *Brock T.D.* // Science. 1967. V. 158. P. 1012–1019.
24. *Sawle L., Ghosh K.* // Biophys. J. 2011. V. 101. P. 217–227.
25. *Kumar S., Nussinov R.* // 2011. Cell. Mol. Life Sci. V. 58. P. 1216–1233.
26. *Karshikoff A., Ladenshtein R.* // Prot. Engineering. 1998. V. 11. № 10. P. 867–872.
27. *Kamel S., Thiele I., Neubauer P., Wagner SA.* // BBA Prot. Proteom. 2020. V. 1868. № 2. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140304>
28. *Visser D.F., Hennessy F., Rashamuse J., Pletschke B., Brady D.* // J. Mol. Cat. B: Enzymatic. 2011. V. 68. P. 279–285.
29. *Oliva I., Zuffi G., Barile D., Orsini G., Tonon G., De Gioias L., Ghisotti D.* // J. Biochem. 2004. V. 135. № 4. P. 495–499.
30. *Luke K.A., Higgins C.L., Wittung-Stafshede P.* // FEBS J. 2007. V. 274. P. 4023–4033.
31. *Imanaka T.* // Proc. Jpn. Acad., Ser. 2011. V. 87. № 9. P. 587–602.
32. *Алемасов Н.А., Фомин Э.С.* // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2012. Т. 16. № 4/1. С. 774–783.
33. *Гришин Д.В., Покровская М.В., Подобед О.В., Гладиллина Ю.А., Покровский В.С., Александрова С.С., Соколов Н.Н.* // Биомед. химия. 2017. Т. 63. № 2. С. 124–131.
34. <http://gibk26.bio.kyutech.ac.jp/jouhou/Protherm/protherm.html>
35. *Razvi A., Scholtz J.M.* // Protein Sci. 2006. V. 15. № 7. P. 1569–1578
36. *Мордкович Н.Н., Сафонова Т.Н., Антипов А.Н., Манувера В.А., Поляков К.М., Окорокова Н.А., Вейко В.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 1. С. 16–25.
37. *Dumorne K., Cordova D.C., Astorga-Elo M., Renganaathan P.* // J. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 27. № 4. P. 649–659.
38. *Pucci F., Dhanani M., Dehouck Y., Rooman M.* // PLoS ONE. 2014. V. 9. № 3. e91659.
39. *Caradoc-Davies T.T., Cutfield S.M., Lamont I.L., Cutfield J.F.* // J. Mol. Biol. 2004. V. 337. № 2. P. 337–354.
40. *Pugmire M.J., Ealick S.E.* // Structure. 1998. V. 6. № 11. P. 1467–147.
41. *Safonova T.N., Mordkovich N.N., Veiko V.P., Okorokova N.A., Manuvera V.A., Dorovatovskii P.V., Popov V.O., Polyakov K.M.* // Acta Crystallogr. D Struct. Biol. 2016. V. 72. № 2. P. 203–210.

Study of the Nature of Thermal Stability of Nucleoside Phosphorylases from Prokaryotes

N. N. Mordkovich^a, A. N. Antipov^a, N. A. Okorokova^a, T. N. Safonova^a,
K. M. Polyakov^b, and V. P. Veiko^{a,*}

^aFederal Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^bEngelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow 119991 Russia

*e-mail: vladveiko@yahoo.com

Based on *Escherichia coli* cells, a library of producer strains of recombinant nucleoside phosphorylases (NP), their mutant and hybrid forms from various mesophilic and extremophilic microorganisms were constructed. It was shown that substrates stabilize the NP installation upon thermal exposure to these proteins. In this case, it is the inorganic phosphate ion that is decisive in this process. Using bioinformatic analysis methods, it is suggested that the N-terminal structure of proteins is largely determined by the thermal stability of NP. A thymidine phosphorylase from *E. coli* hybrid protein was constructed, in which the N-terminal fragment (1–62 amino acid residues) was replaced with the corresponding TPP fragment from thermophilic bacteria *Geobacillus stearothermophilus*, and it was shown that the thermal stability of the obtained hybrid form of TPP was increased. In the primary structure of uridine phosphorylase (UDP) from *E. coli*, a highly conserved sequence of 25-Pro-Gly-Asp-Pro-30 (the number of amino acid residues by UDP from *E. coli*) for these enzymes from mesophilic microorganisms was revealed. Constructed mutant form UDP (Asp27Gly) from *E. coli*, which also showed increased thermal stability compared to the original form. The highest assumption is that it is architecture of the phosphate-binding site, and the features of its functioning are crucial for the development of enzyme stability.

Keywords: nucleoside phosphorylase, site-directed mutagenesis, thermal stability