

УДК 577.145.622+577.27+615.37

ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ ИЗ ПРОКАРИОТ. I. РОЛЬ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА БЕЛКА В ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ УРИДИНФОСФОРИЛАЗ

© 2022 г. В. П. Вейко^{1, 2, *}, А. Н. Антипов¹, Н. Н. Мордкович¹, Н. А. Огорокова¹,
Т. Н. Сафонова¹, К. М. Поляков³

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115522 Россия

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: vladveiko@yahoo.com

Поступила в редакцию 09.06.2022 г.

После доработки 23.06.2022 г.

Принята к публикации 04.07.2022 г.

Методом сайт-направленного мутагенеза сконструированы мутантные гены уридинфосфоорилазы (SoUDP) из *Shewanella oneidensis* MR-1 и на основе клеток *Escherichia coli* получены штаммы-продуценты соответствующих рекомбинантных (F5I и F5G) белков. Белки очищены и изучены их физико-химические и ферментативные свойства. Показано, что N-концевой фрагмент уридинфосфоорилазы выполняет важную роль в термостабилизации фермента в целом. Выявлена роль аминокислотного остатка фенилаланина (F5) в формировании термотолерантности уридинфосфоорилаз из гамма-протеобактерий.

Ключевые слова: нуклеозидфосфоорилаза, сайт-направленный мутагенез, термостабильность, *Shewanella oneidensis* MR-1

DOI: 10.31857/S0555109922060150

Термостабильность белковых структур подразумевает сохранение способности к неискаженному выполнению их основных природных функций при повышенных (часто непермиссивных для организма или микроорганизма-хозяина) температурах. В случае ферментов, этим функциональным признаком является сохранение структуры его активного центра в неизменном (в пределах допустимого для проявления функциональной активности) виде или способности к быстрому восстановлению белком своей ферментативной активности при возвращении его в “стандартные” буферные, субстратные и температурные условия. Следует отметить, что термостабильность ферментов не всегда сопровождается значительным увеличением температурного оптимума ($T_{\text{опт}}$) функционирования этих белков [1]. Более того, само значение $T_{\text{опт}}$ не может служить надежным признаком, указывающим на термостабильность самой белковой молекулы в целом [1, 2]. В цитируемых работах справедливо утверждается, что в настоящее время развитие математических методов надежного предсказания $T_{\text{опт}}$ и термостабильности существенно лимитируется отсутствием данных о

свойствах мутантных форм одного и того же класса белков.

Действительно, если кратко суммировать расчетные методические подходы к исследованиям термостабильности белков, то можно выделить следующие направления, в числе которых, безусловно, доминируют чисто теоретические:

– разработка компьютерных алгоритмов, анализирующих, в аспекте термостабильности, гидрофобные и электростатические взаимодействия как в самих белках, так и взаимодействия белка с компонентами буферных систем, в которых они находятся [3–6];

– создание компьютерных алгоритмов, анализирующих физико-химические причины проявления термостабильности у белков [7, 8];

– сравнение первичных структур белков из мезофильных и термофильных микроорганизмов с целью определения закономерностей формирования термостабильных белковых структур [9–11] и роли в этом процессе отдельных аминокислотных остатков.

Обозначенные выше подходы математического анализа белковых структур с целью предска-

ния и искусственного повышения их термостабильности достаточно полно представлены в обзорах [11–16].

Однако предсказательный потенциал этих алгоритмов всякий раз необходимо проверять с помощью широкого спектра достаточно трудоемких экспериментальных подходов (включая и сравнительный рентгеноструктурный анализ исходных и мутантных форм белков), что приводит к определенным ограничениям этой важной информации в научной литературе. В связи с вышеуказанным, для исследования принципов формирования термостабильных белков важно выбрать полипептиды одного класса и, с помощью введения отдельных аминокислотных замен (точечные мутации) или протяженных белковых фрагментов (гибридные белки), выявить вклад этих изменений в придании белкам устойчивости к температурному воздействию.

В качестве таких белков в данном исследовании были выбраны нуклеозидфосфоорилазы (NP) – ферменты катаболизма нуклеозидов, осуществляющие фосфорилиз нуклеозидов до рибозо-(дезоксирибозо)-1-фосфата и соответствующего гетероциклического основания [17]. NP обнаруживаются в клетках практически всех организмов и являются объектом достаточно пристального внимания исследователей что обусловлено, по крайней мере, двумя причинами:

– выяснением роли этих ферментов в генезисе, развитии и протекании различных патологических процессов в клетках млекопитающих (онкология, ревматоидный артрит, подагра, остеоартроз, системная склеродермия и др.) [18–22];

– высоким биотехнологическим потенциалом NP при ферментативном синтезе производных нуклеозидов, применяющихся в практической медицине (противоопухолевые и противовирусные агенты, ингибиторы репликации клеточной ДНК и т.д.) [23–28].

В настоящее время клонировано множество генов NP из различных (включая и экстремофильные) прокариотических микроорганизмов, определены их первичные и пространственные структуры, а также исследованы ферментативные и физико-химические свойства соответствующих белков [29–37].

Этот факт открывает новые возможности в систематическом анализе полученных ранее экспериментальных данных при выяснении роли отдельных аминокислотных остатков (а.о.) и протяженных участков полипептидной цепи как в функционировании самих ферментов, так и формировании признака термотолерантности у этого класса белков.

Цель работы – исследование роли N-концевой части белка и, в частности, высоконсервативного остатка фенилаланина (F5) у уридинфосфоорилаз

из мезофильных микроорганизмов в формировании термостабильных форм этих ферментов.

МЕТОДИКА

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

Выделение ДНК, очистку, гидролиз эндонуклеазами рестрикции, лигирование фрагментов ДНК, а также трансформацию клеток *E. coli* плазмидами проводили согласно [38].

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

Штаммы *E. coli* JM110 и C600Δ*udpRecA*-(*thrB leuB lacY supE tonA recA Tn10*) предоставлены Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов (НИЦ “Курчатовский институт”-ГосНИИгенетика”, Россия).

Источником рекомбинантной SoUDP из *S. oneidensis* MR-1 служил полученный нами ранее штамм-продукт этого фермента [39].

При конструировании мутантных форм гена *udp* в качестве матричной ДНК использовали бактериальный вектор pSUDP [39], содержащий в своем составе полноразмерный ген *udp* из *S. oneidensis* MR-1. После проведения, согласно [40–42], сайт-направленного мутагенеза, гены мутантных форм *udp* клонировали в составе плазмидного вектора pTZ57R/T (“Thermo Scientific”, Литва).

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов и сиквенс ДНК проводился фирмой “Синтол” (Россия) на коммерческой основе. Структуры использованных в работе олигодезоксирибонуклеотидов приведены в табл. 1.

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

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 пробир-

Таблица 1. Структуры синтетических олигодезоксирибонуклеотидов

Наименование	Структура 5'–3'	Функция
F5Ipr	ATGGCTGATGTAATTCATTTAGG	Замена F5I в SoUDP
F5Irev	ССТАААТГААТТАСАТСАГССАТ	
F5Gpr	ATGGCTGATGTAGGCCATTTAGG	Замена F5G в SoUDP
F5Grev	ССТАААТГГССАТТАСАТСАГССАТ	
Shud1	TATAGAGCTCTGGCGTACTCCTTGTCGTC	Амплификация фрагментов ДНК при мутагенезе
Shud2	TATAGTCGACTTACGCGAGTAATTTCTTAGCT	

ках (или колбах) со средой LB (ампициллин – 150 мкг/мл) при 37°C и 250 об./мин в шейкер-инкубаторе “Excella E25” (“New Brunswick Scientific”, США).

Выделение и очистку рекомбинантных NP и их мутантных форм проводили, как описано нами ранее для SoUDP [39].

Электрофоретическое разделение белков проводили согласно Леммли [43].

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [44] с окраской реагентом “Bio-Rad Protein Assay” (“Bio-Rad”, США). В качестве стандарта использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (“Sigma”, США).

Ферментативную активность рекомбинантных SoUDP и ее мутантных форм определяли в К-фосфатном буфере согласно [45, 46].

Численное значение констант Михаэлиса (K_M) по уридину и неорганическому фосфату определяли как описано ранее [42].

Термостабильность белков определяли согласно [1, 47]. В качестве показателя термостабильности использовали T_{50} – значение температуры, при которой наблюдали 50%-ное снижение ферментативной активности белка при указанной температуре [48].

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) как описано ранее [42]. В качестве белков-маркеров использовали набор “Gel Filtration Calibration Kits” (GE Healthcare Life Sciences”, Великобритания), а также рекомбинантную SoUDP из *S. oneidensis* MR-1 [39].

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

Построение пространственных структур осуществляли с использованием программы PyMol (www.pymol.org).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование природы формирования термостабильных белков в настоящее время является одним из наиболее актуальных направлений белковой инженерии, что обусловлено как стремлением выяснить молекулярные основы формирования и функционирования термотолерантных белков, так и практической целью – применением ферментов для биокатализа при синтезе [32, 49] различных органических соединений (“зеленая химия”), включая и модифицированные нуклеозиды [23, 24, 37, 50]. Использование ферментативного синтеза этих соединений имеет ряд преимуществ по сравнению с химическим вариантом их получения: практически полное исключение токсичных органических реагентов и растворителей, а также высокий уровень стерео- и регио-селективности. Последнее практически недостижимо при химическом синтезе и существенно затрудняет выделение целевого изомера из реакционной смеси.

Для увеличения растворимости исходных соединений и повышения выхода целевого вещества часто требуется проведение ферментативного синтеза при повышенной температуре [28, 51]. Соответственно, сам белок-катализатор должен быть устойчив к воздействию повышенной температуры, что может быть достигнуто внесением в структуру белка-катализатора множественных или точечных аминокислотных замен, улучшающих или даже меняющих его субстратную специфичность [52], а также повышающих его термостабильность [1, 5, 36, 48, 53].

Сравнительный анализ первичных структур UDP из различных микроорганизмов (рис. 1), опирающийся на выравнивание по функциональным участкам, например, PGDP – часть фосфат-связывающего сайта [1, 54] фермента, показал, что в первичной структуре уридинфосфорилаз обнаруживается инвариантный остаток

N-концевая часть	Микроорганизм	GenBank
(a)	MSKSDV FHL GLTKNDLQGATLAI PGDP DRV <i>Escherichia coli</i>	NC_000913
	MSKSDV FHL GLTKNDLQGATLAI PGDP ERV <i>Klebsiella pneumoniae</i>	CDO16248
	MPQSDV FHL GLTKADLQGATLAI PGDP ERV <i>Erwinia pyrifoliae</i>	CAY72523.1
	MADV FHL GLTKAMLDGATLAI PGDP ERV <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	GQ294526
	MSKSDV FHL GLTKNDLQGATLAI PGDP ERV <i>Klebsiella aerogenes</i>	NZ_LR134475
	MSKSDV FHL GLTKNDLQGAQLAI PGDP ERV <i>Salmonella typhimurium</i>	NC_003197.2
	MTKTV FHL GVTEADLNGATLAI PGDP PARV <i>Vibrio cholerae</i>	AKB06100.1
(б)	MSERLKSASRPESEEGRL YHL QVKPGDVSRYILL PGDP DRV <i>Desulfurococcus amylolyticus</i>	AFL66855*
	MER GKRLSSASAPVDESGRV YHL GVKPGDVSRYVLL PGDP GRV <i>Staphylothermus marinus</i>	WP_011838765.1*
	MVKALKSASTPETEEGR QYH LEVKPGDVSRYVLL PGDP GRV <i>Thermosphaera aggregans</i>	WP_013129600.1*
	MYSPPRFMRLLFAFYKAYDKVMEMKFVSADRPQTEEG YQH IACKPGDVARYVLL PGDP ERV <i>Thermococcus barophilus</i>	ALM74274.1*
	MGDESLRSAARPEGEGGL QYH LRVRRGDVARYVLL PGDP ERT <i>Aeropyrum pernix</i>	WP_131160395*
	MPGPRRTGGLAVTGEKVRAREPSGGGL QYH IKCRPGDVAPTLL PGDP ERV <i>Thermofilum pendens</i>	WP_011752903*

Рис. 1. Функциональное выравнивание первичных структур N-концевых частей уридинфосфорилаз из различных микроорганизмов. Желтым цветом выделен фрагмент полипептидной цепи, принимающий участие в формировании сайта связывания иона неорганического фосфата [1, 42], а красным – инвариантные аминокислотные остатки **FH** и **YH** у уридинфосфорилаз из мезофильных (а) и термофильных (б) микроорганизмов соответственно. (*Термофильные микроорганизмы).

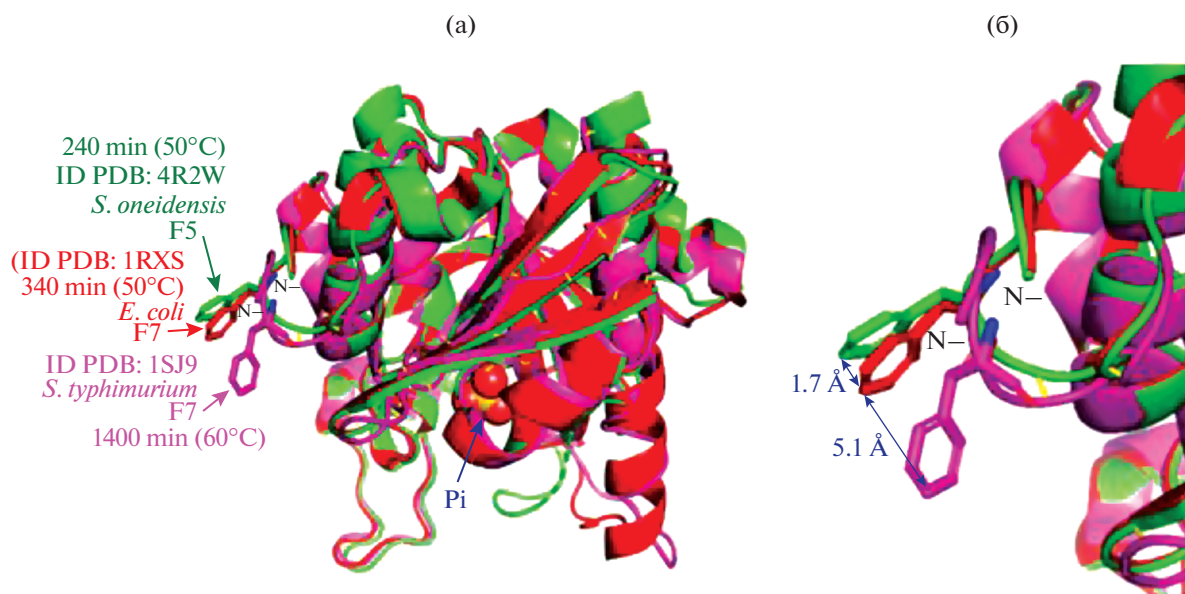


Рис. 2. Совмещение пространственных структур (субъединица А) мономеров UDP (а) из *S. oneidensis* MR-1 (ID PDB: 4R2W, зеленый цвет), *E. coli* (ID PDB: 1RXS, красный цвет), *S. typhimurium* (ID PDB: 1SJ9, бирюзовый цвет). Для ферментов приведены значения времени (T_{50}) их термальной полуинактивации [1]. Pi – ион неорганического фосфата в активном центре фермента. Увеличенное представление пространственного расположения остатков фенилаланина (б). Стрелками указаны взаимные расстояния боковых радикалов.

гистидина, принимающий участие в формировании активного центра фермента [54–56]. Этот остаток локализуется в составе малоструктурированного N-концевого участка полипептидной цепи (рис. 1, рис. 2), которому предшествует также инвариантный у уридинфосфорилаз из мезофилов остаток фенилаланина (рис. 1а, рис. 2). Ранее была исследована роль остатка гистидина (H8) в функционировании UDP из *E. coli* и было обна-

ружено, что замена H8N практически полностью отменяла ферментативную активность этого белка [55]. Эти данные во многом были подтверждены в работе [56].

К сожалению, в настоящее время в научной литературе практически отсутствуют данные по пространственной организации уридинфосфорилаз из термофильных микроорганизмов, что затрудняет прямой сравнительный кристаллографический

анализ структур этих белков в ряду мезофилов – термофилы. Однако, если предположить общность строения активных центров у нуклеозидфосфорилаз [42, 56], то инвариантный остаток гистидина UDP из термофилов (рис. 1б) также может выполнять функцию связывания углеводного остатка нуклеозида в активном центре фермента. Обращает на себя внимание, что в UDP из термофильных микроорганизмов этому остатку (рис. 1б) предшествует существенно более протяженный, по сравнению с уридинфосфорилазами из мезофилов, N-концевой фрагмент полипептидной цепи.

Этот фрагмент может вносить значительную роль в стабилизацию вторичной структуры N-концевого участка полипептидной цепи UDP, обеспечивая устойчивое и наиболее благоприятное для катализа конформационное состояние рассматриваемого остатка гистидина. Такая своеобразная “защитная” функция этого фрагмента полипептидной цепи может проявляться и в повышенной устойчивости уридинфосфорилаз из термофилов при температурном воздействии на них.

Сравнительный анализ первичных структур N-концевых частей UDP из мезофильных и термофильных микроорганизмов (рис. 1) также показывает, что рассматриваемому остатку гистидина у мезофилов предшествует остаток фенилаланина, в то время как у термофилов – остаток тирозина. Учитывая большую гидрофильность остатка тирозина по сравнению с остатком фенилаланина, а также его расположение в непосредственной близости к функционально важному остатку гистидина, можно предположить существенную роль именно этого остатка в придании уридинфосфорилазам термальной устойчивости. Следует также отметить, что, по результатам анализа, проведенном в работе [9], поверхность белков из термофильных микроорганизмов в большей степени, по сравнению с мезофилами, обогащена именно заряженными аминокислотными остатками. Эти данные также привлекали внимание к рассматриваемому гидрофобному остатку фенилаланина, расположенному на поверхности уридинфосфорилаз и осуществляющему прямой контакт с окружающим белок раствором (ID PDB: 4R2W, 1RXS, 1SJ9, 6EYP, 4NY1 и др.).

Высказанные выше предположения о роли структуры N-концевых частей UDP в термальной стабилизации во многом основываются и на ранее полученных и исследованных авторами нуклеозидфосфорилазах, в которых проводились точечные и протяженные аминокислотные замены в составе этого класса гомологичных белков [1, 41]. Анализ суммарных результатов, приведенных в цитируемых работах, показал, что именно структура N-концевых частей нуклеозидфосфо-

риаз является одним из факторов, во многом определяющим термальную устойчивость у этого класса ферментов.

Кроме того, в работе [1] было обнаружено, что термостабильность (T_{50}) нативных уридинфосфорилаз изменяется в ряду *S. typhimurium* \gg *E. coli* $>$ *S. oneidensis* MR-1. В настоящее время известны рентгеноструктурные данные кристаллических форм указанных UDP, что позволило провести сравнительный анализ их пространственных структур (рис. 2).

Обращает на себя внимание (рис. 2) существенное различие в пространственном расположении остатка фенилаланина в составе N-концевых частей рассматриваемых нуклеозидфосфорилаз. Такого рода локальные изменения расположения остатка фенилаланина могут сказываться на свойствах белка в растворе, в том числе и его термостабильности, что достаточно убедительно отмечалось в обзорной работе [57]. В случае уридинфосфорилаз прослеживается определенная корреляция удельной активности [42] и термостабильности [1] этих ферментов в зависимости от первичной структуры анализируемого фрагмента полипептидной цепи белков (рис. 2).

Вышеуказанный анализ литературных данных предопределил необходимость экспериментального исследования, на примере UDP из *S. oneidensis* MR-1, роли остатка фенилаланина (F5) в термостабилизации бактериальных уридинфосфорилаз.

С этой целью в структурной части гена уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 методом сайт-направленного мутагенеза [42] с использованием синтетических праймеров (табл. 1) была произведена замена кодона фенилаланина (F5) на кодоны глицина (F5G) и изолейцина (F5I). Выбор типа замещающих аминокислотных остатков был предопределен следующими причинами: остаток изолейцина обладает относительно гидрофобным боковым радикалом, частично моделирующим свойства остатка фенилаланина, несущего ароматический боковой радикал, в то время как остаток глицина вообще лишен бокового радикала.

Полученные мутантные формы гена *udp* были клонированы в составе вектора pTZ57R/T (“Thermo Scientific”, Литва) и нуклеотидную последовательность целевых генов подтверждали сиквенсом. Рекомбинантными плазмидами были трансформированы клетки *E. coli* C600Dudp (см. “Методика”). Оценка накопления мутантных форм UDP проводилась с помощью денатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза (рис. 3).

Из рис. 3 следует, что целевые мутантные формы SoUDP в условиях гетерологичной экспрессии накапливаются в клетках *E. coli* в значительном количестве: на электрофорезе они представлены в виде мажорной полосы с примерной молекуляр-

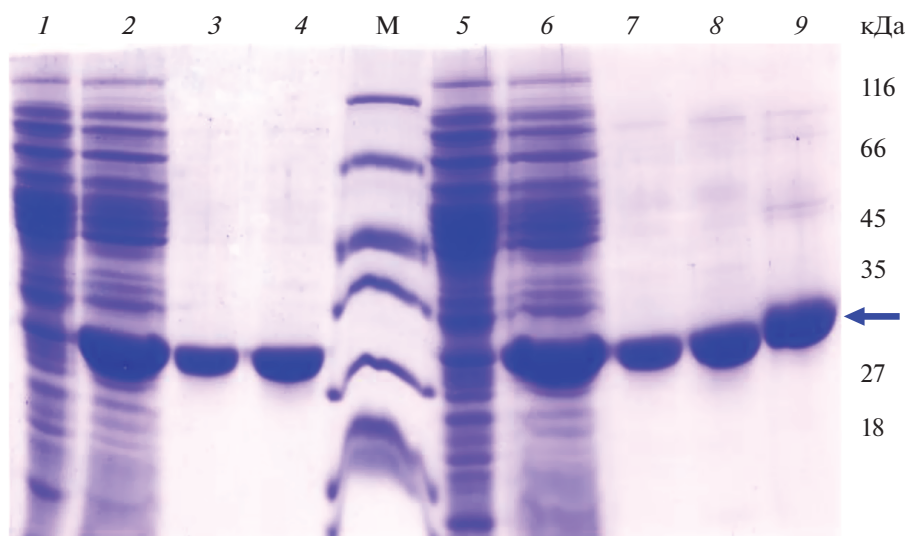


Рис. 3. Электрофоретический анализ рекомбинантных белков в клетках *E. coli* C600Δudr в 12.5%-ном ПААГ с ДСН-*Na*. М – маркеры молекулярной массы белков (116, 66, 45, 35, 27, 18 кДа); 1, 2, 5, 6 – белки растворимых фракций штамма-реципиента и штаммов-продуцентов, полученные после разрушения ультразвуком клеток *E. coli*; 3, 4, 7, 8 – очищенные рекомбинантные ферменты: F5I, F5G, 3 и 5 мкг соответственно; 9 – SoUDP из *S. oneidensis* MR-1, 5 мкг. Целевые рекомбинантные белки обозначены стрелкой.

ной массой 27.5 кДа. Мутантные формы SoUDP выделяли и очищали согласно [39], после чего с помощью ультрафильтрации (мембрана PM30, “Millipore”, США) переводили в 5.0 мМ раствор Трис-НСl, рН 8.0 и хранили при –70°С.

В настоящее время в литературе опубликованы данные по изучению свойств ряда нуклеозидфосфорилаз, включая их термостабильные и мутантные формы [1, 36, 37, 58].

Исследование термостабильности этих белков проводили с использованием не только различных буферных систем, но и часто в присутствии хотя бы одного (например, неорганический фосфат) из субстратов [58, 59]. Однако ранее было показано [1, 60], что в присутствии субстратов происходит термостабилизация нуклеозидфосфорилаз. Более того, присутствие чужеродного белка (например, БСА [60]), также повышает устойчивость нуклеозидфосфорилаз к температурному воздействию. При этом эффективность такой стабилизации малопрогнозируема как для исходной формы исследуемых белков, так и мутантов на их основе. Отдельные аспекты конформационных изменений в бактериальных уридинфосфорилазах при связывании с субстратами описаны нами ранее в работе [61]. Чтобы исключить влияние субстрата на термостабилизацию исследуемых SoUDP и ее мутантных форм (рис. 4) в настоящей работе ферменты инкубировали аналогично [1, 62] в 20 мМ Трис-НСl буфере, рН 8.0.

Приведенные на рис. 2 и 4 результаты свидетельствуют о том, что пространственное расположение бокового радикала остатка фенилаланина

может влиять на конформацию малоструктурированного N-концевого участка в целом, вследствие чего, вероятно, изменяется его доступность для окружающего белок буфера, что и выражается в повышении термостабильности рекомбинантных мутантных форм исследуемой SoUDP. При этом конформационные изменения N-концевого фрагмента могут быть и незначительными, но при этом оказывать существенное влияние на устойчивость белка к термальному воздействию [32, 57].

Четвертичная структура ряда ферментов, включая и нуклеозидфосфорилазы, представлена в растворе в виде гомоолигомеров (димеры, тримеры, гексамеры). Такого рода олигомеризация важна не только для проявления ферментативной активности этих белков, но и для увеличения их термостабильности [6, 63, 64]. В связи с этим, методом аналитической гель-фильтрации было экспериментально подтверждено сохранение мутантными формами SoUDP гексамерной четвертичной структуры (табл. 2).

Обращает на себя внимание (табл. 2) уменьшение сродства (K_M) у мутантных форм уридинфосфорилазы к субстратам по сравнению с исходной формой дикого типа. При этом указанное изменение сопровождалось существенным увеличением термостабильности мутантных белков (табл. 2, рис. 4). Этот факт во многом совпадает со сделанными ранее выводами об определяющей роли архитектурного строения фосфат-связывающей области в приобретении NP термостабильности [1]. В настоящее время получены кристаллические формы исследуемых мутантных белков и прово-

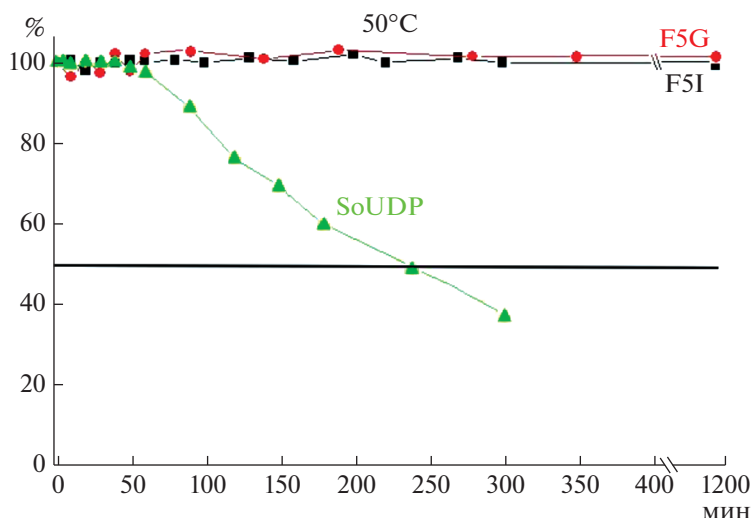


Рис. 4. Сравнительный анализ термостабильности уридинфосфорилазы (%) из *S. oneidensis* MR-1 (SoUDP) и ее мутантных (F5G и F5I) форм. Каждая точка на графике соответствует среднему значению трех независимых экспериментов.

Таблица 2. Сравнительная характеристика свойств SoUDP и ее мутантных форм

Белок	$T_{\text{опт.}}$, °C	T_{50} , 50°C, мин	T_{50} , 60°C, мин	K_M		$V_{\text{вых}}$, мл
				Urd, ммоль	Pi, ммоль	
SoUDP	60 ± 4	240 ± 4	14 ± 2	0.49 ± 0.05	5.5 ± 0.3	13.85 ± 0.05
F5I	58 ± 3	Стабилен 1200 ± 9	15 ± 3	0.77 ± 0.04	9.3 ± 0.2	14.03 ± 0.04
F5G	61 ± 2	Стабилен 1200 ± 10	18 ± 2	0.84 ± 0.08	8.9 ± 0.1	13.98 ± 0.06

дится их рентгеноструктурный анализ, который может существенно прояснить молекулярную природу наблюдаемого явления.

Таким образом, на основании сравнительного анализа литературных данных и полученных в настоящей работе экспериментальных результатов выявлена важная роль, как отдельного аминокислотного остатка F5, так и в целом N-концевого фрагмента полипептида, в формировании термостабильности у уридинфосфорилаз.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мордкович Н.Н., Антипов А.Н., Окорокова Н.А., Сафонова Т.Н., Поляков К.М., Вейко В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 6. С. 577–586.
2. Pucci F., Dhanani M., Dehouck Y., Rooman M. // PLoS ONE. 2014. V. 9. № 3. e91659. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091659>
3. Xiao L., Honig B. // J. Mol. Biol. 1999. V. 289. № 5. P. 1435–1444.
4. Zhu S., Elcock A. // J. Chem. Theory Computat. 2010. V. 6. № 4. P. 1293–1306.
5. Spector S., Wang M., Carp S.A., Robblee J., Hendsch Z.S., Fairman R., Tidor B., Raleigh D.P. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 872–879.
6. Tanaka Y., Tsumoto K., Yasutake Y., Umetsu M., Yao M., Fukada H., Tanaka I., Kumagai I. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 31. P. 32957–32967.
7. Seeliger D., De Groot B. // Biophys. J. 2010. V. 98. № 10. P. 2309–2316.
8. Dehouck Y., Grosfils A., Folch B., Gilis D., Bogaerts P., Rooman M. // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 19. P. 2537–2543.
9. Szilagyi A., Zavodszky P. // Structure. 2000. V. 8. № 5. P. 493–504.
10. Kumar S., Tsai C., Nussinov R. // Prot. Engineering. 2000. V. 13. № 3. P. 179–191.
11. Grishin D.V., Pokrovskaya M.V., Podobed O.V., Gladilina J.A., Pokrovsky V.S., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. // Biomed. Khim. 2017. V. 63. № 2. P. 124–131.

12. *Matthews B.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1993. V. 62. № 1. P. 139–160.
13. *Scandurra R., Consalvi V., Chiaraluce R., Politi L., Engel P.* // *Biochimie.* 1998. V. 80. № 11. P. 933–941.
14. *Fang X., Huang J., Zhang R., Wang F., Zhang Q., Li G., Yan J., Zhang H., Yan J., Xu L.* // *J. Chem. Inf. Model.* 2019. V. 59. № 11. P. 4833–4843.
15. *Modarres H.P., Mofrad M.R., Sanati-Nezhad A.* // *PLoS ONE.* 2018. V. 13. № 1. e0191222. doi.org: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191222>
16. *Xu Z., Cen Y.K., Zou S.P., Xue Y.P., Zheng Y.G.* // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2020. V. 40. № 1. P. 83–98.
17. *Hammer-Jespersen K.* // *Metabolism of Nucleotides, Nucleosides and Nucleobases in Microorganisms* / Ed. A. Munch-Petersen London, N.Y., San Francisco: Acad. Press, 1983. P. 203–258.
18. *Liekens S., De Clercq E., Neyts J.* // *Biochem. Pharmacol.* 2001. V. 61. № 3. P. 253–270.
19. *Carmeliet P.* // *Nature.* 2005. V. 438. № 7070. P. 932–936.
20. *Furukawa T., Tabata S., Yamamoto M., Kawahara K., Shinsato Y., Minami K., Shimokawa M., Akiyama S.* // *Pharmacol. Res.* 2018. V. 132. P. 15–20.
21. *Yan R., Wan L., Pizzorno G., Cao D.* // *Front. Biosci.* 2006. V. 11. P. 2759–2766.
22. *Yu E.J., Lee Y., Rha S.Y., Kim T.S., Chung H.C., Oh B.K. et al.* // *Mol. Cancer Res.* 2008. V. 6. № 10. P. 1554–1556.
23. *Михайлопуло И.А., Мирошников А.И.* // *Acta Naturae.* 2010. T. 2. № 2. С. 38–61.
24. *Gordon G.E.R., Visser D.F., Brady D., Raseroka N., Bode M.L.* // *J. Biotechnol.* 2011. V. 151. № 1. P. 108–113.
25. *Hori N., Watanabe M., Yamazaki Y., Mikami Y.* // *Agr. Biol. Chem.* 1989. V. 53. № 1. P. 197–202.
26. *Luo W., Liu Y., Zhu X., Zhao W., Huang L., Cai J., Xu Z., Cen P.* // *Zyyme Microb. Tech.* 2011. V. 48. № 6–7. P. 438–444.
27. *Zhu S., Ren L., Wang J., Zheng G., Tang P.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012. V. 22. № 5. P. 2102–2104.
28. *Zhu S., Song D., Gong C., Tang P., Li X., Wang J., Zheng G.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 97. P. 6769–6778.
29. *Kumar S., Nussinov R.* // *Cell. Mol. Life Sci.* 2011. V. 58. P. 1216–1233.
30. *Karshikoff A., Ladenshtein R.* // *Prot. Engineering.* 1998. V. 11. № 10. P. 867–872.
31. *Gianese G., Bossa F., Pascarella S.* // *Proteins.* 2002. V. 47. P. 236–249.
32. *Vieille C., Zeikus G.J.* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001. V. 65. P. 1–43.
33. *Brock T.D.* // *Science.* 1967. V. 158. P. 1012–1019.
34. *Trivedi S., Gehlot H.S., Rao S.R.* // *Gen. Mol. Res.* 2006. V. 5. № 4. P. 816–827.
35. *Sawle L., Ghosh K.* // *Biophys. J.* 2011. V. 101. P. 217–227.
36. *Visser D.F., Hennessy F., Rashamuse J., Pletschke B., Brady D.* // *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* 2011. V. 68. P. 279–285.
37. *Kamel S., Thiele I., Neubauer P., Wagner S.A.* // *BBA Prot. Proteom.* 2020. V. 1868. № 2. 140304. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140304>
38. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 545 p.
39. *Мордкович Н.Н., Манувера В.А., Вейко В.П., Дебабов В.Г.* // *Биотехнология.* 2012. № 1. С. 21–30.
40. *Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R.* // *Gene.* 1989. V. 77. № 1. P. 51–59.
41. *Чеботаев Д.В., Гулько Л.Б., Вейко В.П.* // *Биоорганическая химия.* 2001. Т. 27. № 3. С. 184–190.
42. *Мордкович Н.Н., Сафонова Т.Н., Антипов А.Н., Манувера В.А., Поляков К.М., Огорокова Н.А., Вейко В.П.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2018. Т. 54. № 1. С. 16–25.
43. *Laemmli U.K.* // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
44. *Bradford M.M.* // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
45. *Вейко В.П., Супрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Андрияшина Р.В., Дебабов В.Г.* // *Биотехнология.* 1994. № 4. С. 2–4.
46. *Leer J.C., Hammer-Jespersen K., Schwartz M.* // *Eur. J. Biochem.* 1977. V. 75. № 1. P. 217–24.
47. *Cacciapuoti G., Bertoldo C., Brio A., Zappia V., Porcelli M.* // *Extremophiles.* 2003. V. 7. P. 159–168.
48. *Mansfeld J., Vriend G., Dijkstra B.W., Veltman O.R., Van den Burg B., Venema G. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 17. P. 11152–11156.
49. *Straathof A.J.J., Panke S., Schmid A.* // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002. V. 13. № 6. P. 548–556.
50. *Li N., Smith T.J., Zong M.H.* // *Biotechnol. Adv.* 2010. V. 28. № 3. P. 348–366.
51. *Yeoman C.J., Han Y., Dodd D., Schroeder C.M., Mackie R.I., Cann I.K.O.* // *Adv. Appl. Microbiol.* 2010. V. 70. P. 1–55.
52. *Han R., Liu L., Shin H.D., Chen R.R., Li J., Du G., Chend J.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. № 24. P. 7562–7568.
53. *Reetz M.T., Carballeira J.D., Vogel A.* // *Angew. Chem. Int.* 2006. V. 45. № 46. P. 7745–7751.
54. *Safonova T.N., Mikhailov S.N., Veiko V.P., Mordkovich N.N., Manuvera V.A., Alekseev C.S. et al.* // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2014. V. 70. № 12. P. 3310–3319.
55. *Вейко В.П., Супрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б.* // *Биоорганическая химия.* 1995. Т. 21. № 11. С. 834–837.
56. *Oliva I., Zuffi G., Barile D., Orsini G., Tonon G., De Gioias L., Ghisotti D.* // *J. Biochem.* 2004. V. 135. № 4. P. 495–499.
57. *Koshland E.D.* // *Nat. Med.* 1998. V. 4. № 10. P. 1112–1114.
58. *Szeker K., Zhou X., Schwab T., Casanuevas A., Cowanc D., Mikhailopulo I.A., Neubauer P.* // *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* 2012. V. 84. P. 27–34.
59. *Liu K., Zhou Y., Zhang J., Chu J., Zhang Y., He B.* // *Biotechnol. Lett.* 2017. V. 39. № 12. P. 1903–1910.
60. *Koszalka G.W., Vanhooke J., Short S.A., Hall W.W.* // *J. Bacteriol.* 1988. V. 170. № 8. P. 3493–3498.
61. *Поляков К.М., Мордкович Н.Н., Сафонова Т.Н., Антипов А.Н., Огорокова Н.А., Дороватовский П.В., Вейко В.П.* // *Кристаллография.* 2021. Т. 66. № 5. С. 759–764.
62. *Saunders P.P., Wilson B.A., Saunders G.F.* // *J. Biol. Chem.* 1969. V. 244. № 13. P. 3691–3697.
63. *Ali M.H., Imperiali B.* // *Bioorg. Med. Chem.* 2005. V. 13. № 17. P. 5013–5020.
64. *Bertosa B., Mikleusevic G., Wielgus-Kutrowska B., Narczyk M., Hajnic M., Aster I.L., Tomic S., Luic M., Bzowska A.* // *FEBS J.* 2014. V. 281. P. 1860–1871.

**Thermostability of Nucleoside Phosphorylases from Prokaryotes.
I. The Role of the Primary Structure of the N-terminal Fragment
of the Protein in the Thermostability of Uridine Phosphorylases**

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

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

^b Research Centre for Medical Genetics (RCMG), Moscow, 115522 Russia

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

*e-mail: vladveiko@yahoo.com

Mutant uridine phosphorylase genes from *Shewanella oneidensis* MR-1 (*S. oneidensis*) were constructed by site-directed mutagenesis and strains-producers of the corresponding recombinant (F5I and F5G) proteins were obtained on the basis of *Escherichia coli* cells. The mutant proteins were purified and their physicochemical and enzymatic properties were studied. It was shown that the N-terminal fragment of uridine phosphorylase plays an important role in the thermal stabilization of the enzyme as a whole. The role of the amino acid (a.a.) residue phenylalanine (F5) in the formation of thermotolerance of uridine phosphorylases from gamma-proteobacteria was revealed.

Keywords: nucleoside phosphorylase, site-directed mutagenesis, thermal stability, *Shewanella oneidensis* MR-1