

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73 + 577.1

ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗЫ ИЗ ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *Halomonas chromatireducens*

© 2023 г. Т. Н. Сафонова^{1,*}, А. Н. Антипов¹, **В. П. Вейко**¹, Н. Н. Мордкович^{1,2},
Н. А. Окорочкова¹, П. В. Дороватовский³, К. М. Поляков^{4,**}

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия

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

³Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

⁴Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

*E-mail: tn_safonova@mail.ru

**E-mail: kmpolyakov@gmail.com

Поступила в редакцию 16.06.2023 г.

После доработки 16.06.2023 г.

Принята к публикации 28.08.2023 г.

Кристаллы фермента пурииннуклеозидфосфорилазы из экстремофильной бактерии *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3, подходящие для рентгеноструктурного исследования, выращены методом диффузии паров. Дифракционный набор от полученных кристаллов собран до разрешения 1.8 Å на станции белковой кристаллографии “Белок” синхротрона Национального исследовательского центра “Курчатовский институт” при температуре 100 К. Набор данных обработан для пр. гр. $P1$, $P2$, $P2_1$ и $P622$. Решение методом молекулярного замещения с учетом двойникования было найдено для групп $P2_1$ и $P1$, содержащих в независимой части элементарной ячейки один и два гексамера фермента соответственно.

DOI: 10.31857/S0023476123600301, EDN: XSCQXA

ВВЕДЕНИЕ

Пурииннуклеозидфосфорилазы (ПНФ, КФ 2.4.2.1) – ферменты нуклеинового обмена, участвующие в утилизации и реутилизации пуриновых нуклеотидов. Они катализируют обратимый фосфоролиз пуриновых нуклеозидов как природного происхождения, так и их модифицированных аналогов с образованием рибозо-1-фосфата и соответствующих оснований [1, 2]. ПНФ также катализируют реакцию трансгликозилирования, т.е. перенос углеводного остатка от одного нуклеозида на другое нуклеиновое основание с образованием нового нуклеозида [3]. Эта реакция является основной в запасном пути синтеза нуклеозидов и служит единственным источником пуриновых оснований в организмах, где не происходит синтез нуклеозидов *de novo*. ПНФ разделяются на два подсемейства – гомотримеры, обнаруженные в основном в эукариотах, и гомогексамеры (тримеры димеров), обнаруженные в основном в бактериях. Субъединицы тримерных и гексамерных форм ПНФ имеют близкие структуры [2] и различаются главным образом своей субстратной специфичностью. Так, тримерные ПНФ используют только 6-оксопуриновые рибонуклеозиды в качестве субстрата, в то время как

гексамерные ПНФ могут использовать как 6-оксопуриновые рибонуклеозиды, так и 6-аминопуриновые рибонуклеозиды [4, 5].

Внимание исследователей к изучению этой группы ферментов определяется несколькими факторами: биотехнологическим потенциалом при ферментативном синтезе производных нуклеозидов, которые могут обладать противовирусным и противоопухолевым действием [6–8], а также разработкой эффективных ингибиторов ПНФ, используемых при терапии онкологических заболеваний [9–13]. Трансфекция гена бактериальной ПНФ в раковые клетки человека стимулирует экспрессию бактериальной ПНФ, приводя к превращению производных нуклеозидов, устойчивых к действию ПНФ человека (так называемые пролекарства), в пуриновые основания, токсичные для клеток опухоли [4, 14, 15]. Различная субстратная специфичность ПНФ человека и ряда паразитических микроорганизмов позволяет селективно ингибировать синтез пуринов *de novo* в организме. Поиск эффективных ингибиторов этого фермента для обеспечения селективного Т-клеточного статуса организма при химиотерапии ряда патологий является актуальной задачей.

Для эффективного решения этих задач, а также для направленного получения мутантных форм фермента для применения в медицине и биотехнологии паразитов необходимо детальное знание структуры фермента, его функций и механизма реакции, а также взаимосвязи между структурой фермента и его активностью.

К настоящему времени клонирован ряд генов ПНФ из разных микроорганизмов. Однако данные рентгеноструктурного анализа (РСА) для этих ферментов в основном относятся к ПНФ из *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Helicobacter pylori* и других модельных или патогенных видов микроорганизмов. Поэтому представляет интерес изучение этих белков из микроорганизмов, относящихся к группе экстремофилов, поскольку способность к росту в экстремальных условиях предполагает присутствие в клетках ферментов с измененными свойствами, в том числе нуклеозидфосфорилаз. В [16] был клонирован ген *deoD Halomonas chromatireducens* AGD 8-3 и проведена его гетерологичная экспрессия в клетках *E. coli*. Рекомбинантный белок ПНФ был выделен и очищен, его основные ферментативные свойства изучены. Выбор микроорганизма для детального изучения новой ПНФ был обусловлен несколькими факторами: принадлежностью к классу γ -протеобактерий, экстремальными условиями обитания. Грамотрицательная денитрифицирующая факультативно галоалкалофильная бактерия *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3 была выделена из содовых солончаков Кулундинской степи (Россия). Эта бактерия способна к росту при аномально высоком уровне солености (2.7 М NaCl) и щелочном значении среды (pH 9.5–10.0) [17]. Экстремальные условия обитания данного микроорганизма могли привести к формированию в клетках ферментов, включая НПФ, адаптированных к необычной для других мезофилов (*E. coli* и *S. oneidensis* MR-1) концентрации ионов щелочного металла (натрия).

Несмотря на то что в международном Банке белковых структур (PDB) имеются данные для множества ПНФ из разных источников, среди них нет ни одной структуры из этой экстремофильной бактерии. Детальное изучение структурно-функциональной организации ПНФ из *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3 (HrPNP) методом РСА позволит выявить ключевые аминокислотные остатки, определяющие экстремофильные свойства фермента, в частности его термостабильность, и в дальнейшем получить мутанты с улучшенными характеристиками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение препарата пуриннонуклеозидфосфорилазы. Клонирование гена ПНФ из экстремофильной бактерии *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3, получение высокоэффективного рекомбинантного штамма-продуцента HrPNP, и фермента-

тивные характеристики описаны в [16]. Рекомбинантная HrPNP была выделена методами ионообменной хроматографии в гомогенном состоянии. Выделение и очистку HrPNP проводили по методике, описанной в [18]. Первичная структура была подтверждена методом MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометрического анализа триптического гидролизата. Ферментативную активность HrPNP определяли в калий-фосфатном буфере по методике [8].

Определение четвертичной структуры HrPNP проводили методом аналитической гель-фильтрации на колонке Tricorn 10/300 с сорбентом Superdex 200 с использованием прибора АКТА FPLC (“GE Healthcare”, Великобритания) в 10 mM натрий-фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 150 mM NaCl. В качестве белков-маркеров использовали набор “Gel Filtration Calibration Kits” (GE Healthcare Life Sciences, Великобритания), а также рекомбинантную уридинфосфорилазу из *E. coli*. Показано, что HrPNP образует гексамерную форму.

Кристаллизацию HrPNP проводили методом “висячей капли” посредством диффузии в парах при комнатной температуре в термостатированной комнате. Использовали наборы для кристаллизации (скрининга) глобулярных белков компании Hampton Research. Лиофильно высушенный препарат HrPNP растворяли в деионизированной воде (MilliQ) с концентрацией 20 мг/мл. Раствор белка центрифугировали непосредственно перед кристаллизацией на микроцентрифуге со скоростью 18000 об./мин в течение 10 мин для удаления инородных частиц и агрегатов. Каждая капля состояла из 2.0 мкл раствора белка и 2.0 мкл противораствора. Объем противораствора в резервуаре составлял 400 мкл. Кристаллизацию проводили в пластиковых планшетах для висячих капель “Lindbro” фирмы Hampton Research с использованием силиконизированных стекол диаметром 22 мм фирмы Hampton Research. Кристаллы, подходящие для РСА, вырастали в течение одной недели с использованием 0.1 М Bis-Tris-буфера (pH 6.5), содержащего 0.2 М сульфата аммония и ПЭГ 3350 (25 мас. %), в качестве противораствора.

Сбор и обработка дифракционных данных. Набор дифракционных данных собран до разрешения 1.80 Å на станции белковой кристаллографии “Белок” синхротрона Национального исследовательского центра “Курчатовский институт” при температуре 100 К. Перед началом РСА кристаллы помещали в криораствор, приготовленный из кристаллизационного раствора с добавлением 25% глицерина. Обработку дифракционных данных проводили с помощью программ XDS и XSCALE [19].

Решение и уточнение структуры. Структура принадлежит пр. гр. P1, параметры ячейки приведены в табл. 1. Систематических погасаний для осевых рефлексов не наблюдается. В этом случае

Таблица 1. Статистика сбора данных, уточнение структуры HgPNP из *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3 в различных пространственных группах

Пр. гр.	$P622$	$P2_1$	$P1$
Параметры ячейки, Å; град	$a = 93.06, b = 93.06, c = 96.94; \gamma = 120$	$a = 92.24, b = 93.51, c = 92.34; \beta = 120.03$	$a = 92.36, b = 96.92, c = 92.48; \alpha = 89.97, \beta = 120.02, \gamma = 90.38$
Разрешение, Å	50.0–1.81 (1.92–1.81)	40.00–1.9 (1.95–1.90)	40.00–1.9 (2.03–1.90)
Среднее $I/\sigma(I)$	9.47 (2.96)	8.05 (3.06)	3.8 (1.57)
Полнота, %	94.7 (99.1)	98.0 (97.3)	95.1 (93.0)
Решение методом молекулярного замещения		гексамер	два гексамера
$R_{\text{meas}}, \%$	15.2 (90.5)	12.8 (58.3)	11.5 (38.6)
CC(1/2), %	99.6 (88.8)	99.3 (88.9)	98.7 (88.0)
Число доменов двойникования		6	12
Заселенности доменов		0.2108, 0.2059, 0.1435, 0.1377, 0.1531, 0.1490	0.1463, 0.1361, 0.0562, 0.0686, 0.0714, 0.0833, 0.0678, 0.0476, 0.0624, 0.0439, 0.1072, 0.1098
$R_{\text{cryst}}, \%$		20.17	16.54
Среднеквадратичные отклонения в длинах связей, Å		0.015	0.019
Среднеквадратичные отклонения в валентных углах, град		2.8	3.5
Число атомов белка		10837	21 550
Число молекул растворителя		35	284

параметры элементарной ячейки a и c приблизительно равны, углы α и γ приблизительно равны 90° , а угол β близок к 120° . Такие параметры элементарной ячейки позволяют предположить повышение симметрии до моноклинной или гексагональной сингоний. Набор был обработан для пр. гр. $P2$, $P2_1$ и $P622$ (табл. 1). Для групп $P2$ и $P622$ не удалось найти решение методом молекулярного замещения. Для группы $P2_1$ решение было найдено. Выявлено, что в независимой части элементарной ячейки локализуется один гексамер. Субъединицы этого гексамера расположены в плоскости, перпендикулярной оси второго порядка. Однако в этой группе не выполняется условие погасания рефлексов по оси $0k0$ ($k = 2n$). Для пр. гр. $P1$ было найдено решение структуры методом молекулярного замещения. Независимая часть элементарной ячейки содержит два гексамера.

Уточнение с помощью программы REFMAC5 [20] было проведено для пр. гр. $P1$ и $P2_1$ (табл. 1). В обоих случаях уточнение плохо сходится без учета возможности двойникования. При уточнении с учетом двойникования (шесть доменов для $P2_1$ и 12 доменов для $P1$) статистические характе-

ристики моделей (табл. 1) и качество электронной плотности значительно улучшаются, однако наблюдаются значительные отклонения в значениях длин связей, валентных и торсионных углов от стандартных значений. Кроме того, при уточнении в структурах удается локализовать только малое количество молекул растворителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В пр. гр. $P1$ независимая часть элементарной ячейки содержит два гексамера. Оба этих гексамера лежат в двух плоскостях, перпендикулярных кристаллографической оси b (рис. 1). В кристалле каждый из этих гексамеров образует слои, которые сформированы одной из кристаллографически независимых молекул и ее копиями, размноженными трансляционными элементами симметрии. Такие два слоя образуют двойной слой, в котором молекулы имеют плотные контакты внутри слоев, в то время как контакты между молекулами из разных слоев слабые (рис. 1). Такая двухслойная упаковка молекул из слабо связанных слоев способствует формированию двойников в кристалле.

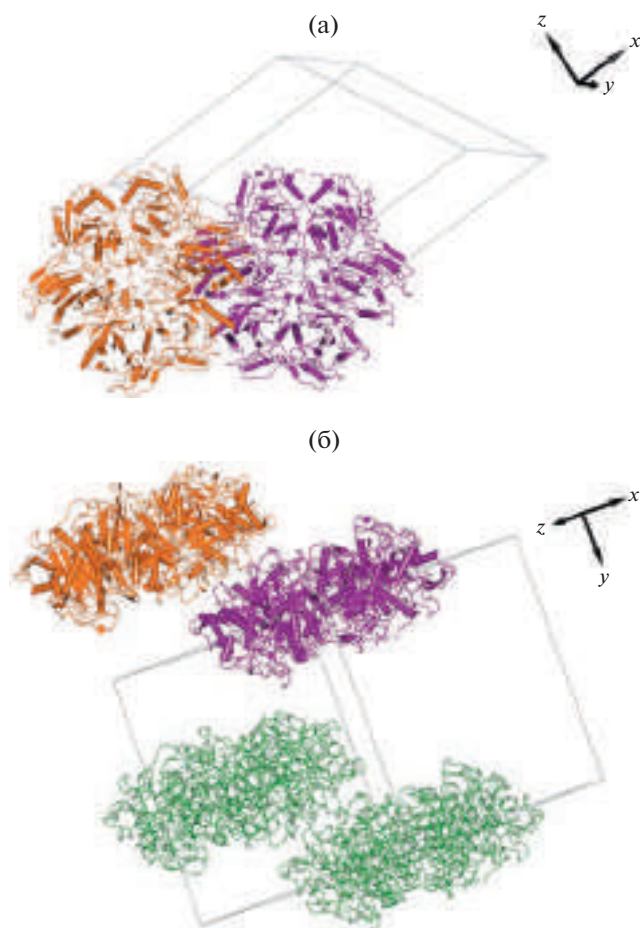


Рис. 1. Две взаимно перпендикулярные проекции кристаллической структуры двух гексамеров HrpNP из *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3 из независимой части элементарной ячейки: а — ось *b* лежит в плоскости рисунка, а гексамеры расположены перпендикулярно этой оси; б — гексамеры расположены приблизительно в плоскости рисунка.

Показано, что строение гексамерной молекулы HrpNP из *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3 близко к строению молекул ПНФ из других источников, кристаллические структуры которых были определены ранее. Все субъединицы находятся в открытой конформации. Однако делать выводы о деталях строения HrpNP из *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3 на основании полученных структур нельзя. Планируется продолжить работу по поиску другой кристаллической модификации фермента с отсутствием двойникования, а также получению кристаллов HrpNP в комплексах с ингибиторами или субстратами, что также может способствовать получению рентгеновских данных хорошего качества.

Исследование проведено в рамках выполнения работ по Государственному заданию Института биохимии им. А.Н. Баха, ФНИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” с использованием оборудования Центра коллективного

пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ealick S.E., Rule S.A., Carter D.C. et al. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 1812.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)40090-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)40090-2)
2. Mao C., Cook W.J., Zhou M. et al. // Structure. 1997. V. 5. P. 1373.
[https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00287-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00287-6)
3. Krenitsky T.A., Koszalka G.W., Tuttle J.V. // Biochemistry. 1981. V. 20 (12). P. 3615.
<https://doi.org/10.1021/bi00515a048>
4. Bennett E.M., Li C., Allan P.W. et al. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 47110.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M304622200>
5. Ducati R.G., Santos D.S., Basso L.A. // Arch. Biochem. Biophys. 2009. V. 486. P. 155.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.04.011>
6. Михайлопуло И.А., Мирошников А.И. // Acta Naturae. 2010. Т. 2. № 2. С. 36.
<https://doi.org/10.32607/20758251-2010-2-2-36-58>
7. Nannemann D.P., Kaufmann K.W., Meiler J. et al. // Protein Eng. Des. Sel. 2010. V. 23. P. 607.
<https://doi.org/10.1093/protein/gzq033>
8. Xie X., Xia J., He K. et al. // Biotechnol. Lett. 2011. V. 33. P. 1107.
<https://doi.org/10.1007/s10529-011-0535-6>
9. Liekens S., De Clercq E., Neyts J. // Biochem. Pharmacol. 2001. V. 61. № 3. P. 253.
[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00529-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00529-3)
10. Carmeliet P. // Nature. 2005. V. 438. № 7070. P. 932.
<https://doi.org/10.1038/nature04478>
11. Furukawa T., Tabata S., Yamamoto M. et al. // Pharmacol. Res. 2018. V. 132. P. 15.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.03.019>
12. Pant P., Pathak A., Jayaram B. // J. Phys. Chem. B. 2021. V. 125. P. 2856.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c10553>
13. Madrid D.C., Ting L.-M., Waller K.L. et al. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 35899.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M807218200>
14. Myers L.A., Hershfield M.S., Neale W.T. et al. // J. Pediatr. 2004. V. 145. P. 710.
<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2004.06.075>
15. Погосян Л.Г., Нерсесова Л.С., Газарянц М.Г. и др. // Биомед. химия. 2011. Т. 57. № 5. С. 526.
<https://doi.org/10.18097/PBMC20115705526>
16. Антипов А.Н., Мордкович Н.Н., Хижняк Т.В. и др. // Прикл. биохим. микробиол. 2020. Т. 56. № 1. С. 45.
<https://doi.org/10.31857/S055510992001002X>
17. Шаповалова А.А., Хижняк Т.В., Турова Т.П. и др. // Микробиология. 2009. Т. 78. № 1. С. 117.
<https://doi.org/10.1134/S0026261709010135>
18. Мордкович Н.Н., Манувер В.А., Вейко В.П. и др. // Биотехнология. 2012. № 1. С. 21.
19. Kabsch W. // Acta. Cryst. D. 2010. V. 66. P. 125.
<https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
20. Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. P. 355.
<https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>