

На правах рукописи

**Мордкович Надежда Николаевна**

**Исследование особенностей анаэробного дыхания электрогенной  
бактерии *Shewanella oneidensis* MR-1 и структуры  
уридинфосфорилазы из нее**

03.01.03 – молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2014

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биологии ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ФГУП «ГосНИИгенетика») и лаборатории молекулярной инженерии ФГБУН институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук.

**Научный руководитель:**

**Вейко Владимир Петрович**, доктор биологических наук, профессор, ИНБИ РАН, г. Москва.

**Официальные оппоненты:**

**Лазарев Василий Николаевич**, доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией геной инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства России (ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России).

**Птицын Леонид Романович**, доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией Закрытого акционерного общества «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ»).

**Ведущая организация**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2014г. на заседании Диссертационного совета Д217.013.01 при ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» по адресу: 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП «ГосНИИгенетика» и на сайте [www.genetika.ru](http://www.genetika.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2014г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат химических наук, доцент

Воюшина Т.Л.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Способность определенных групп бактерий к восстановлению металлов в процессе роста и анаэробного дыхания делает их все более актуальными для использования как в прикладных исследованиях, связанных с получением электричества, очистке сточных вод, так и в качестве объектов для изучения механизма анаэробного дыхания и элементов его регуляции. Одной из наиболее хорошо изученных бактерий данной группы к настоящему времени является *Shewanella oneidensis* MR-1. Одним из наиболее важных аспектов, привлекающим исследователей к изучению данной бактерии, является ее способность к использованию в качестве акцептора электронов нерастворимые оксиды металлов. Эта особенность позволяет культивировать *S. oneidensis* MR-1 в микробных топливных элементах (МТЭ) для генерации электричества. Увеличение продуктивности МТЭ за счет модификации микроорганизма представляет одну из актуальных задач настоящего времени. Дальнейшее детальное изучение различных аспектов жизнедеятельности данной бактерии во многом будет способствовать выяснению особенностей функционирования генома этого микроорганизма и расширению биотехнологического потенциала *S. oneidensis* MR-1.

Вторым аспектом исследования, проведенного в данной работе, являлось выяснение строения уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1. Данный фермент находится в центре внимания многих исследователей по двум причинам: первая из них заключается в роли уридинфосфорилазы в функционировании клеток злокачественных новообразований млекопитающих. Уридинфосфорилаза является одним из ключевых ферментов, участвующих в метаболизме противоопухолевых соединений нуклеозидной природы, широко применяемых в практической медицине. В литературе показано, что ингибирование данного фермента позволяет существенно уменьшить терапевтическую дозу противоопухолевых соединений и, тем самым, понизить системную токсическую нагрузку на организм пациента. Вторая причина интереса исследователей к уридинфосфорилазе обусловлена возможностью использования данного фермента в качестве биокатализатора при получении новых соединений нуклеозидной природы, обладающих противораковой, противопаразитарной и противовирусной активностями. В свою очередь, использование химико-ферментативного подхода к получению новых соединений нуклеозидной природы выдвигает определенные требования к ферменту в части его термостабильности, рН-чувствительности, специфичности по отношению к субстратам различной природы и т.д. Эти данные могут быть получены только на основе изучения новых типов уридинфосфорилаз, определения их структурно-функциональных особенностей, получения сравнительных характеристик свойств этого фермента из различных источников. Следует отметить, что данное направление исследования носит не только практический, но и глубоко фундаментальный характер, позволяющий не только

прогнозировать изменение свойств данного фермента в зависимости от целенаправленно введенной в его полипептидную цепь мутации, но и, в конечном итоге, построить молекулярно-динамическую модель функционирования этого класса белков (нуклеозидфосфорилаз).

**Цель и задачи исследования.** Целью данной диссертационной работы было изучение влияния взаимосвязи метаболизма и интенсивности анаэробного дыхания у бактерии *S. oneidensis* MR-1, изучение элементов механизма регуляции гена уридинфосфоорилазы (*udp*) из *S. oneidensis* MR-1, изучение физико-химических свойств белка SUDP и структуры его активного центра. В ходе выполнения работы решались следующие задачи:

- 1) Исследование влияния гетерологичной экспрессии гена  $\text{NAD}^+$ -зависимой формиадегидрогеназы из *Moraxella sp.* в клетках электрогенной бактерии *S. oneidensis* MR-1 на изменение интенсивности анаэробного дыхания у штаммов-трансформантов, в том числе при культивировании в МТЭ. Исследование скорости конверсии конечного акцептора электронов.
- 2) Изучение функциональной активности промотер-операторной области гена *udp* из *S. oneidensis* MR-1 в клетках *E. coli*.
- 3) Клонирование гена уридинфосфоорилазы из *S. oneidensis* MR-1, создание рекомбинантного штамма-продуцента этого фермента.
- 4) Определение физико-химических характеристик рекомбинантного белка SUDP.
- 5) Определение аминокислотных остатков, формирующих активный центр уридинфосфоорилазы из *S. oneidensis* MR-1.
- 6) Конструирование штамма-продуцента рекомбинантной мутантной формы SUDP (синонимическая замена C212S) и наработка мутантного фермента. Изучение физико-химических свойств полученного белка.
- 7) Сравнительная характеристика структуры исходного и мутантного белков (РСА) в части связывания неорганического фосфата.

**Научная новизна.** В ходе выполнения данной работы получен штамм-трансформант *S. oneidensis* MR-1, характеризующийся ускоренным анаэробным дыханием и повышенной генерацией плотности тока при культивировании в МТЭ. Показано изменение баланса  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  в клетке бактерии при гетерологичной экспрессии  $\text{NAD}^+$ -формиадегидрогеназы и, как следствие, увеличение интенсивности анаэробного дыхания. Впервые показана функциональная активность промотер-операторной области гена *udp* из *E. coli* при гетерологичной экспрессии в клетках штамма-реципиента *S. oneidensis* MR-1. Впервые клонирован ген уридинфосфоорилазы из *S. oneidensis* MR-1, проведена его гетерологичная экспрессия в клетках *E. coli*. Установлено, что промотер-операторная область гена *udp* из *S. oneidensis* MR-1 не содержит сайт связывания с белком-репрессором CytR и, как следствие, не

подвергается регуляции данным белком-репрессором в клетках *E. coli*. На основе клеток *E. coli* получен рекомбинантный штамм-продуцент белка SUDP (уридинфосфорилаза из *S. oneidensis* MR-1). Фермент выделен и очищен, получены его основные физико-химические характеристики. Получен кристалл данного белка и проведен PCA его пространственной организации. Определены аминокислотные остатки, принимающие участие в формировании активного центра фермента. Сконструирована мутантная форма SUDP (C212S) и получен рекомбинантный штамм-продуцент этого фермента. Мутантная форма белка выделена в гомогенном состоянии и охарактеризована. На основании сравнения полученных характеристик исходной и мутантной форм белка SUDP высказано предположение о ключевой роли петлевых участков 88 – 93 и 212 – 219 а.о. в формировании и поддержании ферментом сайта связывания иона неорганического фосфата (формирование «открытой» и «закрытой» конформаций белка), а также о механизме стабилизации активной структуры фермента ионами калия. Полученные экспериментальные результаты позволяют детализировать особенности третичной и четвертичной структур белка и ведут к пониманию фундаментального процесса – особенностей молекулярного механизма функционирования ферментов данного класса (нуклеозидфосфорилаз).

**Практическая значимость.** Полученные экспериментальные результаты по влиянию изменения баланса  $NAD^+/NADH$  на интенсивность анаэробного дыхания позволяют предложить дальнейшие пути по модификации штамма *S. oneidensis* MR-1 для увеличения продуктивности МТЭ. Выявленные особенности регуляции гена *udp* *S. oneidensis* MR-1 создают новые предпосылки для конструирования экспрессионных векторов на основе CytR-независимого промотера. Уточнение структуры уридинфосфорилазы позволит проводить более точное целенаправленное моделирование и последующий химический синтез специфических ингибиторов фермента, используемых в качестве противоопухолевых, противовирусных и противопаразитарных препаратов. Кроме того, на основании уточненных данных по третичной и четвертичной структурах SUDP, возможно получение фермента с целенаправленно измененными (улучшенными) физико-химическими параметрами (термостабильность, pH-оптимум, субстратная специфичность) и создания высокотехнологичных процессов химико-ферментативного синтеза широкого спектра препаратов нуклеозидной природы для практической медицины.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Показано влияние изменения внутриклеточного баланса  $NAD^+/NADH$  на интенсивность анаэробного дыхания у бактерии *S. oneidensis* MR-1.
2. Установлено отсутствие репрессии белком CytR промотер-операторной области гена уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1.

3. На основании физико-химических и кинетических характеристик, а также данных РСА дикой и мутантной формы C212S уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1, выявлена роль остатка цистеина 212 в формировании устойчивого связывания неорганического фосфат-иона в активном центре фермента. Высказано предположение о ключевой роли петлевых участков 88 – 93 и 212 – 219 а.о. в функционировании уридинфосфорилаз.

**Апробация работы и публикации.** Диссертационная работа была представлена на заседании межлабораторного семинара ФБГУН Института биохимии им. А.Н. Баха РАН и Секции молекулярной биологии Ученого совета ФГУП «ГосНИИгенетика» 11 сентября 2014 года. Результаты работы были представлены на XXV Международной зимней молодежной научной школе “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”, посвященной 30-летию Научно-образовательного центра ИБХ РАН (Москва 2013), на 7-й международной конференции «Recombinant protein production» (Лаупхайм, Германия, 2013), на 38-м конгрессе FEBS «Mechanisms in Biology» (Санкт-Петербург, Россия, 2013), на 5-м международном конгрессе FEMS (Лейпциг, Германия, 2013). По материалам работы опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, а также тезисы в сборниках материалов конференций.

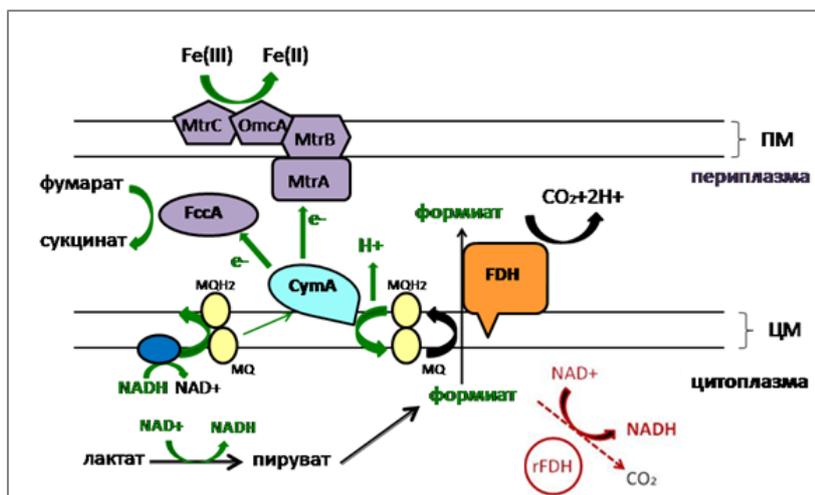
**Структура диссертации:** Диссертация содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы. Работа изложена на 182 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц, 54 рисунка. Список литературных источников содержит 243 ссылки.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **Конструирование рекомбинантного штамма *S. oneidensis* MR-1, характеризующегося повышенной редуцирующей активностью**

Процесс анаэробного дыхания основан на окислении субстрата, с последующей передачей электрона на конечный акцептор. Изменение интенсивности анаэробного дыхания у бактерии *S. oneidensis* MR-1, возможно, могло бы привести к увеличению плотности тока при культивировании в МТЭ. В связи с этим достаточно перспективным подходом для достижения поставленной задачи по увеличению электрогенной продуктивности может быть гетерологичная экспрессия генов в клетках *S. oneidensis* MR-1, прямо или косвенно участвующих в процессах анаэробного дыхания. Процесс окисления-восстановления  $NAD^+/NADH$  является центральным моментом и в функционировании ЭТЦ *S. oneidensis* MR-1. В процессе анаэробного роста клеток *S. oneidensis* MR-1, при утилизации лактата, происходит образование формиата, окисляемого в дальнейшем собственной  $NAD^+$ -независимой

форматдегидрогеназой, локализованной на внешней стороне цитоплазматической мембраны. Таким образом, внесение в клетку в результате гетерологичной экспрессии гена  $NAD^+$ -зависимой форматдегидрогеназы, позволит сдвинуть равновесие  $NAD^+/NADH$  в сторону восстановленной формы, с окислением формата и образованием  $NADH$  в цитоплазме. Графически предполагаемая схема ЭТЦ *S. oneidensis* MR-1, с учетом метаболических изменений при внесении в клетку рекомбинантной  $NAD^+$ -зависимой форматдегидрогеназы, представлена на рисунке 1.



**Рисунок 1.** Схема ЭТЦ *S. oneidensis* MR-1 с учетом изменений при внесении рекомбинантной  $NAD^+$ -зависимой форматдегидрогеназы из метилотрофной бактерии *Moraxella* sp. Красной пунктирной стрелкой обозначено предполагаемое изменение в пути окисления эндогенного формата с образованием дополнительного  $NADH$ . Зелеными стрелками показан поток электронов в ЭТЦ. ЦМ и ПМ – цитоплазматическая и периплазматическая мембраны, соответственно. FDH –  $NAD$ -независимая форматдегидрогеназа *S. oneidensis* MR-1, rFDH – рекомбинантная  $NAD^+$ -зависимая форматдегидрогеназа из *Moraxella* sp., CymA – тетрагемовый цитохром, осуществляющий передачу электрона от пула менахинонов на конечные акцепторы, как FccA – фумарат-редуктазу, или на цитоплазматический переносчик электронов, например, MtrA.

Целенаправленное искусственное изменение баланса  $NAD^+/NADH$ , по высказанному предположению и опубликованным литературным данным для *E. coli* (Berrios-Rivera S.J. et al., 2002), должно будет привести к интенсификации процесса анаэробного дыхания у *S. oneidensis* MR-1.

### Клонирование и исследование гетерологичной экспрессии гена $NAD^+$ -зависимой форматдегидрогеназы из метилотрофной бактерии *Moraxella* sp. в клетках *S. oneidensis* MR-1

В настоящей работе был использован ген  $NAD^+$ -зависимой форматдегидрогеназы из метилотрофной бактерии *Moraxella* sp., также относящейся к порядку  $\gamma$ -протеобактерий, как и штамм-реципиент *S. oneidensis* MR-1. На основании литературных данных по успешному использованию промоторов генов *E. coli*, для проведения гетерологичной экспрессии генов в клетках *S. oneidensis* MR-1 была выбрана промотор-операторная область гена уридинфосфорилазы *E. coli* (*Pudp*). В работе использовалась плаزمида pUC18Rudp, содержащая промотор *Pudp*, сконструированная, на основе плазмиды pUC18, с дополнительно введенным

геном устойчивости к канамицину. Полученной рекомбинантной и контрольной плазмидами была проведена трансформация клеток штамма-реципиента *S. oneidensis* MR-1. Подтверждение наличия гетерологичной экспрессии гена *fdh* в клетках *S. oneidensis* MR-1 проводили путем измерения активности ФДГ в растворимой фракции клеточных лизатов, полученных после разрушения клеток-трансформантов ультразвуком. Данные по активности ФДГ в растворимых фракциях трансформантов *S. oneidensis* MR-1/pERFDH и *S. oneidensis* MR-1/pER приведены в таблице 1.

**Таблица 1.** Активность рекомбинантной ФДГ в клеточном лизате трансформантов *S. oneidensis* MR-1 при культивировании в аэробных и анаэробных условиях при разной концентрации формиата.

Концентрация формиата г/л	Активность ФДГ, ед/мг общего белка			
	<i>S. oneidensis</i> MR-1/pERFDH		<i>S. oneidensis</i> MR-1/pER	
	Аэробно	Анаэробно	Аэробно	Анаэробно
0	0.11±0.01	0.48±0.03	*	
0.5	0.09±0.02	-	*	-
5	-	0.51±0.02	-	*
10	-	0.46±0.03	-	

Условные обозначения: *S. oneidensis* MR-1/pERFDH и *S. oneidensis* MR-1/pER – рекомбинантные штаммы, содержащие плазмиды pERFDH и pER (контрольный штамм), соответственно. \*- активность не обнаружена (меньше 0.01 ед/мг). - культивирование в данных условиях не проводилось.

Полученные данные свидетельствуют о функциональной активности промотер-операторной области *udp* из *E. coli* в клетках *S. oneidensis* MR-1 в разных условиях, и успешной гетерологичной экспрессии гибридного гена *fdh* из *Moraxella* sp.. Определенные значения уровня активности ФДГ в общем лизате сопоставимы по уровню активности с литературными данными при гетерологичной экспрессии гена *fdh* из *C. boidinii* в клетках *E. coli*.

### **Исследование изменения интенсивности анаэробного дыхания при гетерологичной экспрессии NAD<sup>+</sup>-зависимой формиатдегидрогеназы в клетках *S. oneidensis* MR-1**

Достаточно удобной системой определения интенсивности анаэробного дыхания у *S. oneidensis* MR-1 может служить определение скорости конверсии экзогенного фумарата, используемого в качестве акцептора электронов, в сукцинат. Основываясь на полученной нами ранее успешной гетерологичной экспрессии гена *fdh* в клетках *S. oneidensis* MR-1, было проведено измерение концентраций фумарата и сукцината в КЖ трансформантов *S. oneidensis* MR-1/pERFDH и *S. oneidensis* MR-1/pER, при анаэробном культивировании клеток на лактате в присутствии фумарата в течение 3, 6 и 24 часов. Из этих данных (таблица 2) следует, что при культивировании штамма *S. oneidensis* MR-1/pERFDH конверсия фумарата в сукцинат

происходит значительно быстрее, чем у *S. oneidensis* MR-1/pER: существенная разница наблюдается уже на 6 часу культивирования. Этот факт можно объяснить увеличением уровня внутриклеточного NADH, необходимого для восстановления фумарата в сукцинат.

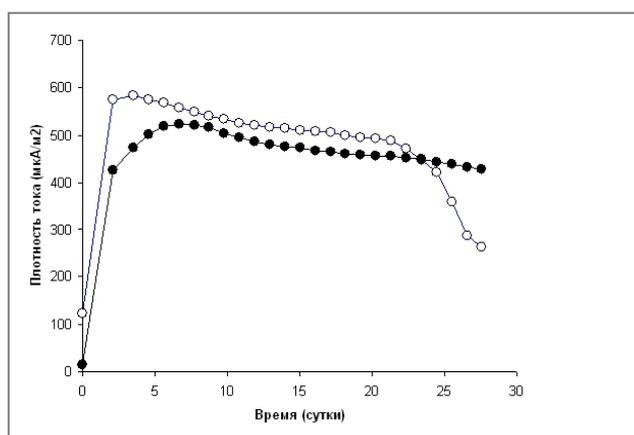
**Таблица 2.** Изменение концентрации фумарата и сукцината в культуральной жидкости при культивировании в анаэробных условиях клеток штаммов-трансформантов *S. oneidensis* MR-1.

Трансформант	Фумарат, мМ				Сукцинат, мМ			
	Время культивирования, час.				Время культивирования, час.			
	0	3	6	24	0	3	6	24
<i>S. oneidensis</i> MR-1/pERFDH	18.4±1.1	14.6±0.9	6.5±0.6	0	0	21.0±1.1	37.8±1.4	44.0±1.7
<i>S. oneidensis</i> MR-1/pER	18.4±0.8	14.8±0.6	11.2±0.7	0	0	18.4±0.9	30.8±1.6	44.0±1.5

Обнаруженное явление ускоренного восстановления фумарата в сукцинат клетками, содержащими рекомбинантную NAD<sup>+</sup>-зависимую ФДГ, давало основание для исследования электрогенных свойств трансформантов в МТЭ.

### Культивирование штамма-трансформанта *S. oneidensis* MR-1/pERFDH в МТЭ

При культивировании клеток штаммов электрогенных микроорганизмов в МТЭ в анаэробных условиях конечным акцептором электронов служит электрод, что дает возможность длительно и напрямую измерять плотность тока в процессе анаэробного дыхания. Для исследования электрогенных свойств полученных в данной работе клеток штаммов-трансформантов было проведено их культивирование в ячейках МТЭ1. Эксперименты с использованием МТЭ проводили в лаборатории 0-132 ГНЦ РФ – ИМБП РАН. На рисунке 2 представлены электрогенные характеристики штаммов-трансформантов в координатах зависимости величины плотности тока от времени культивирования.



**Рисунок 2.** Зависимость величины плотности тока от времени культивирования клеток трансформантов *S. oneidensis* MR-1/pERFDH (○), и *S. oneidensis* MR-1/pER (●) в МТЭ.

Как следует из рисунка 2, максимальное значение плотности тока, достигаемое трансформантом *S. oneidensis* MR-1/pERFDH выше, чем у контрольного штамма. Максимальное значение плотности тока наблюдается на 2-3 сутки культивирования, а у контрольного варианта – на 6-7. Культивирование продолжали в течение 27 суток. Определение остаточного

содержания лактата в среде после культивирования показало полное его отсутствие в среде у трансформанта *S. oneidensis*MR-1/pERFDH и 0.25 г/л в случае контрольного штамма. Полученные данные также свидетельствуют об увеличении уровня внутриклеточного NADH при гетерологичной экспрессии рекомбинантной NAD<sup>+</sup>-зависимой ФДГ, что приводит к интенсификации анаэробного дыхания и, как следствие, увеличению плотности тока при культивировании штамма в МТЭ.

Важным результатом описанных выше исследований также является экспериментально установленная функциональная активность промотер-операторной области гена *udp* *E. coli* в клетках *S. oneidensis* MR-1 при культивировании в аэробных и анаэробных условиях. Полученные результаты подтверждают литературные данные (Shi L. *et al.*, 2005; Ozawa K. *et al.*, 2000) о принципиальной возможности использования промотеров *E. coli* при гетерологичной экспрессии генов в клетках *S. oneidensis* MR-1.

### **Исследование особенностей регуляции экспрессии под контролем промотер-операторной области гена *udp* *S. oneidensis* MR-1**

Сравнение нуклеотидных последовательностей промотер-операторной области гена *udp* *S. oneidensis* MR-1 и *E. coli* выявило как их сходство, так и различия. Основные регуляторные элементы промотера *udp*, такие как CRP1 и CRP2 также практически совпадают (выявлены замены 3-х и 4-х нуклеотидов). Однако, в последовательности промотера *S. oneidensis* MR-1 обнаружены вставки от 4-х до 6-ти нуклеотидов между ними. Кроме того, следует отметить отсутствие в промотере гена *udp* у *S. oneidensis* MR-1 «канонического» сайта связывания для белка-репрессора CytR, обнаруженного у всех изученных ранее видов  $\gamma$ -протеобактерий. Подробный дополнительный компьютерный анализ выявил отсутствие в аннотированном геноме *S. oneidensis* MR-1 (GenBank AE014299.1) гена *cytR*, а поиск по первичной структуре белка CytR *E. coli* с использованием программы BLAST в *S. oneidensis* MR-1 также не выявил соответствующего белка-ортолога. Для выяснения потенциальной принадлежности гена *udp* из *S. oneidensis* MR-1 к CytR-регулону была сконструирована плазида pSR, содержащая только промотер-операторную область *udp* из *S. oneidensis* MR-1 и лишённую участка ДНК, кодирующего белок (UDP). Аналогичная плазида pER, содержащая промотер-операторную область *udp* из *E. coli* была сконструирована в нашей лаборатории ранее. Указанными плазидами pSR и pER трансформировали штамм *E. coli* MG1655 и после культивирования клеток, получали растворимую фракцию клеточного лизата трансформантов обработкой биомассы ультразвуком. Данные по уровню активности цитидиндеаминазы в супернатанте разрушенных клеток приведены в таблице 3.

**Таблица 3.** Активность цитидиндеаминазы в клеточном лизате трансформантов *E. coli* MG1655 в присутствии промотер-операторных областей гена *udp* из *E. coli* и *S. oneidensis* MR-1.

Штамм <i>E. coli</i>	Активность цитиндеаминазы, ед/мг общего белка
MG1655/pER	2.2±0.08
MG1655/pSR	0.02±0.01
MG1655/pUC19 (контроль)	0.02±0.01
MG1655 wt (контроль)	0.04±0.01

Согласно представленным в таблице 3 данным, достоверное повышение активности цитидиндеаминазы хромосомной локализации наблюдается только в случае клеток трансформантов *E. coli* MG1655/p19ER, т.е. при наличии в составе плазмидной ДНК сайта связывания репрессора CytR в составе промотер-операторной области гена *udp* из *E. coli*. В остальных трансформантах уровень активности цитидиндеаминазы практически не изменяется, оставаясь на фоновом уровне. Полученные экспериментальные данные однозначно подтверждают предположение, что ген уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 не подвержен регуляции репрессором CytR.

Полученные нами результаты об отсутствии в геноме *S. oneidensis* MR-1 аннотированного гена *cytR*, подтверждают недавно опубликованные данные о наличии гена *cytR* в геномах бактерий только двух порядков  $\gamma$ -протеобактерий: *Vibrionales* и *Enterobacteriales* (Sernova N.V. *et al.*, 2012). Все опубликованные данные по регуляции генов *udp*, принадлежащих CytR-регулону, получены на бактериях только из двух вышеуказанных порядков (*E. coli*, *S. typhimurium*, *Y. pestis*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*). Следует также отметить, что анализ класса  $\gamma$ -протеобактерий на наличие уридинфосфорилазы, выявил ее присутствие только в 6 порядках: *Thiotrichales*, *Alteromonadales*, *Vibrionales*, *Aeromonadales*, *Pasteurellales*, *Enterobacteriales*. В литературе имеются данные по характеристике UDP только из двух порядков. Этот факт определяет значительный интерес к изучению свойств и получению сравнительной характеристики структуры UDP из *S. oneidensis* MR-1, как представителя другого порядка.

### **Изучение свойств и структурных особенностей уридинфосфорилазы из электрогенной бактерии *S. oneidensis* MR-1**

Уридинфосфорилаза (UDP КФ 2.4.2.3) – фермент катаболизма нуклеозидов, осуществляющий обратимый фосфолиз уридина до урацила и рибозо-1-фосфата. К настоящему времени выделены и охарактеризованы UDP из различных про- и эукариот.

## Клонирование гена уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1, гомологичная и гетерологичная экспрессия гена *udp*

Компьютерный анализ генома *S. oneidensis* MR-1 выявил локус SO\_4133, аннотированный как ген, кодирующий уридинфосфорилазу. С целью экспериментального подтверждения факта наличия функционально активного гена *udp* в составе указанного фрагмента ДНК, нами было проведено клонирование соответствующей части генома *S. oneidensis* MR-1. Рекомбинантная плазида, содержащая клонированный фрагмент, обозначена pSUDP. Первичная последовательность гена была депонирована нами в GenBank (GQ 294526). С целью проверки наличия и эффективности гомологичной экспрессии гена *sudp* была проведена трансформация штамма-реципиента *S. oneidensis* MR-1 плазмидой pSUDP. Кроме того, было проведено дополнительное исследование активности промотера гена *udp* *E. coli* в клетках *S. oneidensis* MR-1 в аэробных и анаэробных условиях (табл. 4). В качестве альтернативной модели использовали определение наличия гетерологичной экспрессии гена *udp* из *E. coli* под контролем аутентичной промотер-операторной области.

**Таблица 4.** Активность уридинфосфорилазы в лизатах клеток трансформантов *S. oneidensis* MR-1 при культивировании в аэробных и анаэробных условиях

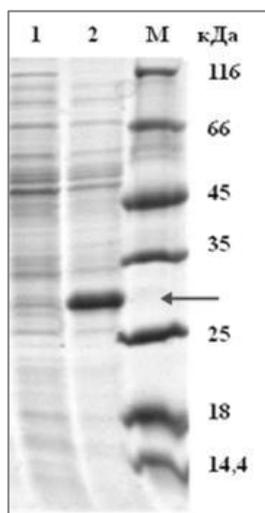
Штамм	Активность UDP, ед/мг общего белка	
	Аэробные условия	Анаэробные условия
<i>S. oneidensis</i> MR-1 wt	1.1±0.07	1.3±0.06
pUC19Km	1.0±0.05	1.0±0.05
pSUDP	4.3±0.08	6.7±0.07
pUUDP Km	3.1±0.07	6.5±0.07

Условные обозначения: *S. oneidensis* MR-1 wt – штамм-реципиент, pUC19Km, pSUDP, pUUDP – трансформанты *S. oneidensis* MR-1 соответствующими плазмидами.

Полученные данные по наличию гомологичной экспрессии гена *udp* в клетках *S. oneidensis* MR-1 позволяют предположить функциональную активность данной промотер-операторной области в клетках *E. coli*. Для проверки данного предположения была проведена трансформация штамма-реципиента *E. coli* С600 плазмидами pSUDP и pUC19Km.

Уровень накопления рекомбинантного белка оценивали с помощью денатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза (рис. 3).

Полученные экспериментальные результаты еще раз подтверждают высказанное нами предположение, что промотер-операторные области уридинфосфорилаз из этих организмов – *E. coli* и *S. oneidensis* MR-1, могут быть эффективно использованы перекрестно в обоих организмах при проведении под их контролем гомо- и гетерологичной экспрессии целевых генов.



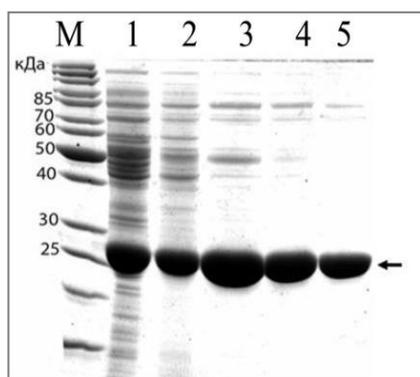
**Рисунок 3.** Электрофоретическое разделение в денатурирующем 12.5% ПААГ белков растворимой фракции, полученной после разрушения биомассы клеток-трансформантов *E. coli* C600 ультразвуком. Фракции растворимых белков клеток штаммов: 1 – C600/pUC19Km, 2 – C600/pSUDP, М-маркер молекулярной массы белков. Стрелкой обозначена полоса рекомбинантной SUDP.

### Структурно-функциональная характеристика уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1

Высокий уровень накопления рекомбинантной уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1, обнаруженный при гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli* (рис. 3), позволяет выделить и очистить этот белок для проведения более детального сравнительного анализа свойств новой SUDP с уже охарактеризованными уридинфосфорилазами. Анализ аминокислотных последовательностей UDP из разных микроорганизмов выявил их значительную, не менее 75%, а в некоторых случаях и до 90% гомологию. Сравнение первичных структур SUDP и модельного белка EUDP с использованием базы данных BLAST выявило 75% идентичных аминокислотных остатков. К настоящему времени наиболее изученным является белок UDP из *E. coli*. Это гомогексамер, каждая субъединица которого состоит из 253 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 27.5 кДа.

#### Выделение и очистка рекомбинантной SUDP

Для определения физико-химических свойств SUDP была осуществлена очистка данного рекомбинантного белка от суммарных белков штамма-производителя *E. coli* C600, содержащего плазмиду pSUDP. На рисунке 4 приведен результат электрофоретического разделения фракций белков в денатурирующем 12.5% ПААГ.



**Рисунок 4.** Электрофоретическое разделение в денатурирующем 12.5% ПААГ фракций, содержащих рекомбинантную уридинфосфорилазу: М – маркеры молекулярной массы. 1 – исходная фракция растворимых белков *E. coli* K-12 C600/pSUDP. 2 – фракция, полученная в результате первой хроматографии. 3–5 – фракция, полученная в результате рехроматографии: нанесены 18 мкг (3), 9 мкг (4) и 4 мкг (5) очищенного белка. Целевой белок обозначен стрелкой.

Как следует из рисунка 4, в результате проведенной хроматографической очистки получен гомогенный препарат рекомбинантного белка. Удельная активность выделенного белка SUDP составила 99.1 ед/мг (при измерении в 0.1 М  $K^+$ -фосфатном буфере pH 7.4).

### **Масс-спектрометрический (MALDI) анализ выделенного белка SUDP и анализ четвертичной структуры SUDP (гель-фильтрация)**

Соответствие первичной структуры рекомбинантной SUDP, аннотированной ранее авторами в GenBank (GQ 294526), подтверждено методами масс-спектрометрии (MALDI). Анализ четвертичной структуры SUDP был проведен методом гель-фильтрации на колонке, заполненной носителем Superdex-200. Калибровку колонки проводили набором белков, включая ранее полученную нами рекомбинантную уридинфосфорилазу из *E. coli* (EUDP), для которой уже была установлена гексамерная форма существования белка в растворе. Экспериментально было установлено, что времена выхода уридинфосфорилаз из *S. oneidensis* MR-1 ( $V_{\text{вых}}$  13.97 мл) и из *E. coli* ( $V_{\text{вых}}$  14.22 мл) практически совпадают. Этот факт подтверждает предположение, что уридинфосфорилаза из *S. oneidensis* MR-1 (SUDP), так же, как и уридинфосфорилаза из *E. coli* (EUDP) формирует в растворе гексамерную четвертичную структуру.

### **Определение температурного, pH-оптимума и изоэлектрической точки SUDP**

Определение температурного оптимума SUDP проводили в диапазоне температур 30-60<sup>0</sup>С с шагом 5<sup>0</sup>С в 10 мМ  $Na^+$ -фосфатном и  $K^+$ -фосфатном буфере pH7.4, pH-оптимума в диапазоне pH 6.0-8.0 с шагом 0.5 ед в 10 мМ  $K^+$ -фосфатном буфере при 37<sup>0</sup>С. Было установлено, что температурный оптимум SUDP имеет разное значение в зависимости от используемого буфера и составляет 47<sup>0</sup>С и 55<sup>0</sup>С для  $Na^+$ - и  $K^+$ -фосфатного буфера, соответственно. Значение pH-оптимума для данного фермента, составило 7.4, а значение pI для SUDP составило 4.55 (табл. 5).

### **Определение константы Михаэлиса по уридину и фосфат-иону для SUDP**

В таблице 5 представлены определенные в данной работе значения  $K_m$  SUDP для двух субстратов – уридина и фосфат-иона. Сравнение полученных значений  $K_m$  с литературными данными для других уридинфосфорилаз (табл. 5) обнаружило наибольшее сходство с  $K_m$  для UDP из *S. typhimurium*.

Полученные характеристики уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 по некоторым параметрам отличаются от опубликованных данных для UDP из других  $\gamma$ -протеобактерий.

Интересно отметить достаточно высокий уровень удельной активности SUDP по сравнению с EUDP.

**Таблица 5.** Физико-химические характеристики уридинфосфорилаз из различных  $\gamma$ -протеобактерий.

UDP	Км, мМ		Уд. акт., ед/мг	pI	T <sub>опт</sub> , °С	pH <sub>опт</sub>	Ссылка
	Urd	P <sub>i</sub>					
<i>S. oneidensis</i> MR-1	0.23±0.02	5.1±0.5	99.1±2.9	4.55	53±2	7.4±0.2	Данная работа
<i>E. coli</i>	0.12	7.69	55.0	-	-	7.3	(Вейко В.П. и др., 1998; Чеботаев Д.В. 2000)
	0.15	7.3	183	-	-	7.3	(Leer J.C. <i>et al.</i> , 1977)
<i>E. aerogenes</i> 4140	0.15	7.2	98.7	-	-	7.3	(Вейко В.П. и др., 1998)
<i>E. aerogenes</i> AJ11125	0.7	-	97.8	-	65	8.5	(Utagawa T. <i>et al.</i> , 1985)
<i>E. aerogenes</i> EAZ1	0.229	-	250.0	4.46	60	7.8	(Ruan Q <i>et al.</i> , 2003)
<i>S. typhimurium</i>	0.21	5.02	129.3	-	-	7.3	(Вейко В.П. и др., 1998; Чеботаев 2000)
<i>S. typhimurium</i> LT2	0.7	4.3	280.0	-	-	7.2-7.4	(Молчан О.К. и др., 1998)

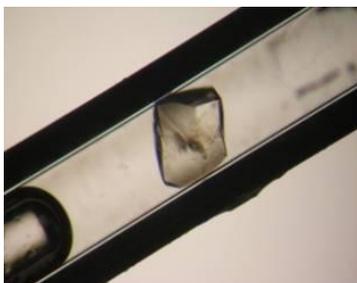
Примечание: - означает отсутствие данных. Условные обозначения: Urd – уридин, P<sub>i</sub> – неорганический фосфат-ион.

Согласно литературным данным, сопоставимый уровень удельной активности был установлен для UDP из *S. typhimurium* и *K. aerogenes*. Значение Км по двум субстратам для SUDP также наиболее близко к данным, опубликованным для UDP из *S. typhimurium*. Однако, несмотря на одинаковое значение pH оптимума для EUDP и SUDP, наблюдается значительное различие в значении температурного оптимума этих ферментов.

### Исследование структуры SUDP методом PCA

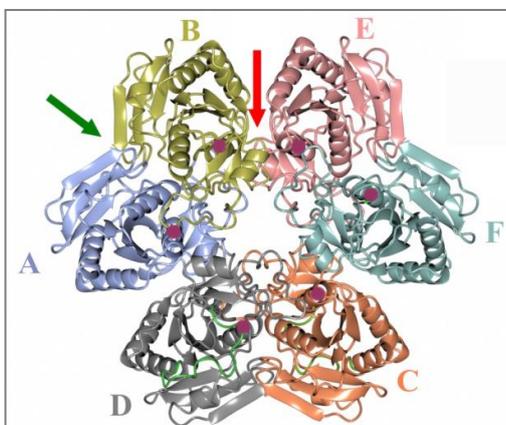
Выделенный, очищенный и охарактеризованный препарат SUDP был передан в лабораторию «Инженерной энзимологии» ИНБИ им.А.Н. Баха РАН для проведения кристаллизации и дальнейшего PCA. Процедуру кристаллизации фермента проводили в лабораторных условиях и в условиях микрогравитации на Международной Космической станции. В результате получены кристаллы белка SUDP в свободной форме высокого качества и большого размера (0.6x0.5x0.5 мм), что позволило в дальнейшем получить набор дифракционных отражений высокого разрешения и определить трехмерную структуру белка. На рисунке 5 представлена фотография кристалла, полученного в условиях микрогравитации.

Рентгеноструктурный анализ кристаллов был проведен на «Станции белковой кристаллографии Белок», НТК КЦСИиНТ. Анализ полученных данных осуществляли к.х.н. Сафонова Т.Н. и к.ф.-м.н. Поляков К.М совместно в лабораториях «Инженерной энзимологии» ИНБИ им. А.Н. Баха РАН и «Конформационной стабильности белков и физических методов анализа» ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН. Структурные данные для SUDP депонированы в Банке данных белковых структур (Protein Data Bank: 4HER, 4HEN).



**Рисунок 5.** Кристалл уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 (в капилляре), полученный в условиях микрогравитации на Международной Космической станции (фотография предоставлена к.х.н. Сафоновой Т.Н).

В ходе анализа данных, полученных в результате проведения PCA, было показано, что SUDP в кристалле, также как и в растворе, образует гексамерную четвертичную структуру, сформированную из шести гомологичных полипептидных цепей (рис. 6). Белок представляет собой тороидальную структуру диаметром примерно  $100\text{\AA}$ , высота тора составляет примерно  $50\text{\AA}$ . Центральный канал всей структуры составляет около  $18\text{\AA}$  в диаметре. Активные сайты в гомодимере фермента располагаются на расстоянии примерно  $22\text{\AA}$ .



**Рисунок 6.** Гексамер SUDP, обозначены атомы только основной цепи. Отдельные субъединицы обозначены как А, В, С, D, Е и F. Красной стрелкой обозначен контакт между гомодимерами, а зеленой – контакт между мономерами в гомодимере. Фиолетовыми кружками условно обозначено расположение активных центров фермента. (рисунок предоставлен к.ф.-м.н. К.М. Поляковым).

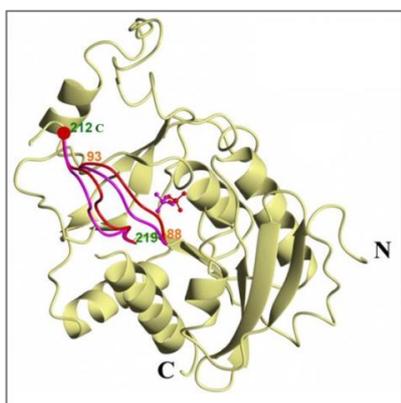
Гексамер образован тремя гомодимерами, которые являются минимальными единицами структурирования активного фермента, поскольку обе субъединицы белка предоставляют аминокислотные остатки для формирования активных центров: Gly23, Arg27, Arg88, Thr91, Gln163, Arg165 и Met194 и др. одной субъединицы, а His5 и Arg45 – от другой. Особое внимание привлекают остатки His5 и Arg45, которые входят в состав активного центра и презентуются соседними субъединицами. Такое взаимодействие субъединиц белка должно дополнительно способствовать закреплению структуры гомодимера как минимальной единицы активного фермента. Полученные данные хорошо согласуются не только с результатами гель-фильтрации, но и с литературными данными, опубликованными для кристаллов UDP из *E. coli*,

*S. typhimurium* и *V. cholerae*, подтверждающими гексамерную форму данных ферментов (Павлюк Б.Ф. 2007; Burling F.T. *et al.*, 2003; Dontsova M.V. *et al.*, 2004; Lashkov A.A. *et al.*, 2012). Особое положение занимает, как следует из РСА, занимает остаток Thr91, который выполняет функцию связывания одновременно уридина и иона неорганического фосфата в структуре мономера уридинфосфорилазы.

На основе данных, полученных методом РСА для уридинфосфорилазы дикого типа из *S. oneidensis* MR-1, было отмечено, что отдельные петлевые участки полипептида (88 – 93 и 212 – 219 а.о.) имеют ярко выраженную флуктуационную подвижность, занимая в различных субъединицах отличающееся относительно белковой глобулы положение, указанное на (рис.7). Более того, на основании данных РСА было установлено, что остаток Cys212 располагается в непосредственной близости от фосфат-связывающей области фермента и входит в состав флуктуационно-подвижного участка 212 – 219 а.о.

С целью исследования функциональной значимости С-концевого участка UDP в целом и отдельного дополнительного, по отношению к инвариантному остатку цистеина С206, остатка цистеина в положении С212 было предпринято введение синонимической замены. Природа замены была определена следующими соображениями:

- Замена должна быть синонимической, т.е. быть своеобразным «миметиком» исходного аминокислотного остатка.
- Замена не должна повторять имеющиеся в природе варианты аминокислот в данном положении, чтобы эффект от вносимой замены был ярко выражен, по крайней мере, либо в рамках ферментативной активности, либо в локальных структурных изменениях самой полипептидной цепи.



**Рисунок 7.** Флуктуация петлевых участков 88 – 93 и 212 – 217 а.о. в молекуле уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 в комплексе с ионом сульфата. Петлевые участки обозначены цветом: красный – «закрытое» положение, фиолетовый – «открытое». Красной точкой отмечено положение остатка Cys212 в структуре SUDP. (Рисунок предоставлен к.ф.-м.н. Поляковым К.М.).

## **Получение и структурно-функциональная характеристика мутантной формы уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 (C212S)**

Синонимическая замена цистеина в положении 212 на остаток серина была проведена методом сайт-направленного мутагенеза. Проведена наработка, выделение и очистка мутантная

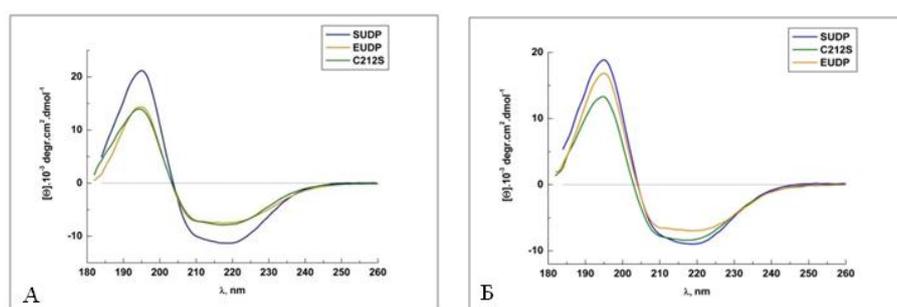
форма SUDP (C212S). При определении удельной активности мутантной уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 было отмечено значительное различие активности выделенного фермента: при измерении в  $K^+$ - и  $Na^+$ -фосфатном буфере. В  $K^+$ -фосфатном буфере она составляла 65.0 ед/мг, тогда как  $Na^+$ -фосфатном – всего 10.2 ед/мг. Соответствие первичной структуры рекомбинантной мутантной формы C212S запланированной подтверждено методами масс-спектрометрии (MALDI). Для определения сохранения гексамерной структуры у выделенного рекомбинантного белка C212S была проведена гель-фильтрация, сопоставление значения  $V_{вых}$  (14.01 мл) мутантной формы C212S со значением  $V_{вых}$ , полученным ранее для SUDP свидетельствует о существовании мутантной формы белка в растворе в гексамерной форме.

### Исследование температурного, рН-оптимумов мутантной формы фермента (C212S) и его изоэлектрической точки

Определение значений температурного оптимума, рН-оптимума и изоэлектрической точки для мутантной формы уридинфосфорилазы (табл. 6) проводили в условиях, аналогичных вышеописанным для уридинфосфорилазы дикого типа.

### Исследование структуры уридинфосфорилаз с помощью кругового дихроизма

Возможное влияние внесенной синонимической замены на элементы вторичной структуры белка SUDP определяли сравнением КД-спектров SUDP, ее мутантной формы (C212S) и маркерного белка EUDP. Спектры КД записывали в 0.1 М  $Na^+$ - и  $K^+$ -фосфатном буферах рН 7.4. На рисунках 8А и 8Б представлены КД-спектры SUDP, мутантной формы C212S и EUDP в присутствии ионов  $Na^+$  и  $K^+$ .



**Рисунок 8.** КД-спектры SUDP, EUDP, C212S: А. в 10мМ  $Na^+$ -фосфатном буфере рН 7.4. Б. в 10мМ  $K^+$ -фосфатном буфере рН 7.4.

Форма и относительная амплитуда КД-спектров SUDP и мутантной формы C212S практически совпадают, что может свидетельствовать об отсутствии существенных нарушений вторичной структуры белка при внесении синонимической замены C212S. Кроме того, сравнение КД-спектров этих белков, записанных в  $K^+$  - и  $Na^+$  -фосфатном буферах, не выявило значительных различий, что может указывать на сохранение общей структуры белка у мутантной формы C212S, независимо от присутствия или отсутствия в буфере иона  $K^+$ . Таким

образом, суммируя полученные данные по значению pI, сохранению гексамерной формы и КД-спектрам, внесенная синонимическая мутация C212S не приводит к критическому нарушению вторичной, третичной или четвертичной структур SUDP в целом.

### Определение значения $K_m$ по фосфату-иону и уридину для мутантной формы C212S

В таблице 6 представлены значения констант Михаэлиса для уридина и фосфат-иона, определенные для мутантной формы C212S. Величина  $K_m$  по уридину практически совпадает со значением  $K_m$  для SUDP (табл.5, табл.6), однако, значение  $K_m$  по фосфату у мутантной формы C212S существенно отличается от исходного фермента, указывая на значительное понижение аффинности белка именно к этому компоненту ферментативной реакции.

**Таблица 6.** Физико-химические характеристики мутантной формы C212S.

Белок	$K_m$ , мМ		Удельная активность ед/мг	pI	$T_{\text{опт}}$ , °C	pH <sub>опт</sub>	ссылка
	Urd	P <sub>i</sub>					
C212S	0.24±0.02	16.1±0.5	65.0±0.6*	4.55	45.0±1.0	7.4±0.2	Данная работа

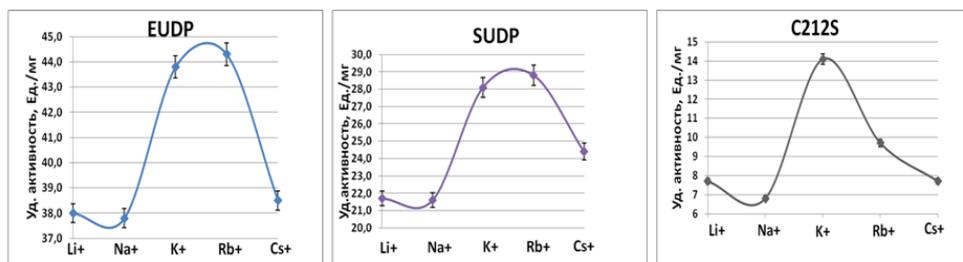
Примечание: \* – удельную активность фермента определяли в 0.1М K<sup>+</sup>-фосфатном буфере, pH 7.4.

В связи с этим, нами высказано предположение о том, что внесенная мутация (C212S) имеет опосредованное влияние на связывание фосфат-иона ферментом, дестабилизируя (или переводя в нефункциональную конформацию) участок полипептидной цепи, включающий данный остаток.

### Влияние неорганических ионов на формирование активной формы исходной SUDP и ее мутантной формы (C212S)

В литературе были опубликованы данные о влиянии иона K<sup>+</sup> на увеличение активности уридинфосфорилазы *E. coli*, а также было показано наличие данного иона в составе кристалла молекулы UDP (Carados-Davies T.T. *et.al.*, 2004; Лашков А.А. и др., 2009). По литературным данным ион K<sup>+</sup>, взаимодействуя с ферментом, определяет конформационные особенности неструктурированного участка полипептидной цепи, позволяя формировать так называемую «открытую» и «закрытую» формы фермента (Донцова М.В. и др., 2004). Мы предположили, что такого рода стабилизация одной из форм фермента должна зависеть от радиуса соответствующего одновалентного катиона. С этой целью в данной работе проведено исследование зависимости активности уридинфосфорилаз SUDP, ее мутантной формы (C212S) и EUDP от присутствия одновалентных ионов щелочных металлов в ряду: Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> и Cs<sup>+</sup> (рис. 9). Обнаруженная тенденция по изменению активности в ряду ионов в сочетании с

сопоставлением изменения размера самого иона позволяет сделать предположение о достаточно важном пространственном координировании ионом  $K^+$  контакта остатков аминокислот при формировании (поддержании) активного центра в молекуле уридинфосфорилазы.



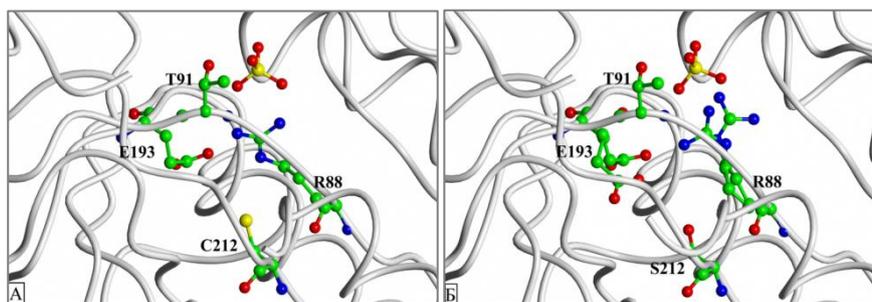
**Рисунок 9.**  
Зависимость удельной активности EUDP, SUDP и ее мутантной формы C212S от радиуса иона щелочного металла.

### Исследование структуры мутантной формы SUDP (C212S) методом РСА

Как показано выше, внесенная в первичную структуру уридинфосфорилазы мутация C212S привела к существенному падению активности фермента, но не выражалась в детектируемых обычными физико-химическими методами изменениях во вторичной, третичной и четвертичной структурах фермента.

В связи с этим, было принято решение провести исследование структуры полученной мутантной формы уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 методом РСА. Для этого мутантный белок был наработан и очищен, аналогично исходной, дикой, форме белка и передан в лабораторию «Инженерной энзимологии» ИНБИ РАН им. А.Н. Баха. Кристаллизацию белка проводили в лабораторных условиях, практически идентичных условиям кристаллизации исходного белка (за исключением микрогравитации). В результате были получены кристаллы мутантной формы уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 и проведен РСА. Исследование структурных изменений в области введенной мутации показало, что внесенная замена приводит к существенной перестройке в области активного центра фермента (рис.10).

Из рисунка 10 следует, что после внесения мутации произошло существенное разупорядочение остатка Arg88 – одного из аминокислотных остатков, принимающих участие в формировании сайта связывания белка с фосфат-ионом (рис. 10А). При этом изменении теряется одна из двух водородных связей с неорганическим фосфатом и остаток Arg88 начинает формировать водородную связь с остатком Ser212. Не менее существенное разупорядочение происходит и с остатком Glu193, принимающим участие в поддержании активного центра фермента (рис.10Б). Вероятно, именно эти, не детектируемые обычными физико-химическими методами, изменения в активном центре фермента и приводят, в конечном итоге, к потере активности уридинфосфорилазы.



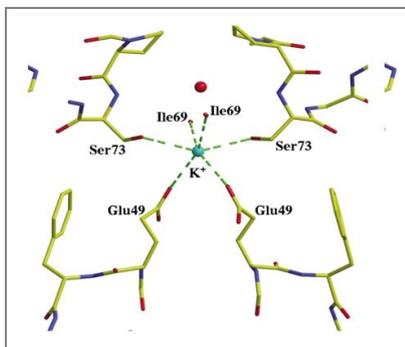
**Рисунок 10.** Структурные изменения в мутантной форме уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1: А – исходная, «дикая», уридинфосфорилаза; Б – мутантная форма белка (C212S). (Рисунок предоставлен к.ф.-м.н. Поляковым К.М.)

Обращает на себя внимание тот факт, что определение  $K_m$  мутантной формы C212S показало практически полное отсутствие влияния внесенной замены на связывание ферментом одного из субстратов – уридина, в то время как сродство к неорганическому фосфату драматически снизилось. Этот факт можно трактовать, в рамках возможных различий в путях несинхронного связывания этих двух субстратов ферментом (различные подцентры начального связывания субстрата). Полученные результаты хорошо согласуются с опубликованными ранее фактами изменения активности гибридных форм уридинфосфорилаз из *E. coli* и *S. typhimurium*.

Одним из любопытных фактов сравнительного рентгеноструктурного анализа особенностей строения исходной и мутантной форм уридинфосфорилаз является то, что внесенная замена (C212S) не оказала никакого влияния на петлю L9 (217 – 227 а.о.): ход полипептидной цепи в этом участке у двух форм фермента идентичен. В связи с этим, можно предположить, что внесение мутаций в состав петли L9, описанные в литературе (Oliva et al., 2004), не только формирует «закрытую» и «открытую» формы фермента, но и может опосредованно, за счет изменения конформации малоструктурированных петлевых участков 88 – 93 и 212 – 219 а.о. оказывать влияние на стабилизацию общего строения именно фосфат-связывающего подцентра белка, который во многом и определяет удельную активность уридинфосфорилазы.

Совокупность результатов по влиянию точечных замен на уровень активности уридинфосфорилазы, опубликованных в литературе (Вейко В.П. и др., 1994; Вейко В.П. и др., 1995; Вейко В.П. и др., 1996), а также описанные в настоящей работе данные по исследованию функциональной активности уридинфосфорилазы в зависимости от присутствия и вида иона щелочного металла (его ионного радиуса), четко указывают, что координирующее действие ионов этих металлов заключается не только в формировании более «плотного» контакта субъединиц в гомодимере, но и, располагаясь пространственно вблизи сайта связывания иона неорганического фосфата он, через попарное комплексообразование с остатками Glu49, Leu69 и Ser73 из двух различных субъединиц в гомодимере, стабилизирует петлевые элементы фермента (88 – 93 и 212 – 219 а.о.), переводя и закрепляя их в наиболее выгодных для связывания иона неорганического фосфата конформациях.

Следует также отметить, что данная перестройка в структуре уридинфосфорилазы носит, действительно, прецизионный характер, присущий изменениям в конформационном расположении отдельных остатков аминокислот и фрагментов полипептидной цепи при функционировании ферментов, и лежит, в пределах 0.4 Å (разница ионных радиусов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ ).



**Рисунок 11.** Координация иона калия в комплексе с EUDP. Иллюстрация из работы (Carados-Davies T.T. *et.al.*, 2004).

Рассмотренные данные по изменению активности мутантных форм уридинфосфорилазы и РСА позволяют также сделать первоначальные предположения о порядке взаимодействия субстратов с ферментом: связывание субстратов, по-видимому, происходит независимо друг от друга, но первичное комплексообразование с уридином переводит подцентр связывания белком фосфат-иона в наиболее конформационно выгодное состояние. Связавшийся с белком ион неорганического фосфата осуществляет фосфоролиз нуклеозида и продукты реакции (урацил и рибозо-1-фосфат) покидают белок. При этом первым покидает фермент именно урацил, т.е., по-видимому, более сильная фиксация белком остатка рибозы является не только решающей в определении субстратной специфичности фермента (рибо- или дезоксирибонуклеозиды), но и формирует наиболее выгодную, отличную от существующей в растворе, конформацию остатка рибозы, способствующую протеканию реакции ферментативного фосфоролиза. В этом процессе, по-видимому, лимитирующим является именно насыщение активного центра ионом фосфата, т.к. вносимые в состав первичной структуры уридинфосфорилазы мутации меньше влияли на сродство белка к урдину, но существенно ухудшали этот показатель по отношению к иону неорганического фосфата (Чеботаев Д.В. и др., 1999; данная работа), что и приводило к ухудшению каталитических характеристик данного фермента.

Полученные новые данные по структуре уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 во многом позволяют сузить поиск при конструировании новых, обладающих повышенной активностью и термостабильностью уридинфосфорилаз (и, в общем, нуклеозидфосфорилаз), прежде всего участками полипептидной цепи, определяющим «закрытую» и «открытую» конформации белка (участки 88 – 93 и 212 – 219 а.о. или их структурные аналоги у других нуклеозидфосфорилаз).

## ВЫВОДЫ

- 1) Показано, что увеличение уровня внутриклеточного NADH при гетерологичной экспрессии NAD<sup>+</sup>-зависимой форматдегидрогеназы в клетках *S. oneidensis* MR-1 приводит к увеличению интенсивности анаэробного дыхания данной бактерии, и, как следствие, увеличению генерируемой плотности тока при культивировании в МТЭ.
- 2) Экспериментально установлена функциональная активность промотера гена уридинфосфорилазы (*udp*) из *E. coli* при гетерологичной экспрессии в клетках *S. oneidensis* MR-1 в аэробных и анаэробных условиях.
- 3) Впервые показано отсутствие репрессии белком CytR из *E. coli* промотера гена *udp* из *S. oneidensis* MR-1.
- 4) Впервые клонирован ген уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1, и экспериментально показано, что его продукт – белок, проявляющий уридинфосфорилазную активность.
- 5) Сконструированы штаммы-продуценты рекомбинантной уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 и ее мутантной формы (C212S). Исследованы физико-химические и ферментативные свойства полученных белков.
- 6) На основе рентгеноструктурного анализа уридинфосфорилазы *S. oneidensis* MR-1 и ее мутантной (C212S) формы определены аминокислотные остатки, формирующие активный центр фермента. Показана общность структуры активных центров уридинфосфорилаз из разных  $\gamma$ -протеобактерий.
- 7) Установлена и объяснена роль остатка цистеина в положении 212 в формировании устойчивого связывания неорганического фосфата в активном центре уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1. Выявлены функциональные участки полипептидной цепи уридинфосфорилазы (88 – 93 и 212 – 219 а.о.) как потенциальные мишени для проведения дальнейших исследований по повышению активности и термостабильности рекомбинантной уридинфосфорилазы.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Н.Н.Мордкович, В.А. Манувера, В.П. Вейко, В.Г. Дебабов. Уридинфосфорилаза из *Shewanella oneidensis* MR-1: Гетерологичная экспрессия, регуляция, транскрипция, свойства. 2012 Биотехнология, №1. С. 21-30.
2. T.N. Safonova, N.N. Mordkovich, K.M. Polyakov, V.A. Manuvera, V.P. Veiko, V.O. Popov. Crystallization of uridine phosphorylase from *Shewanella oneidensis* MR-1 in the laboratory and under microgravity and preliminary X-ray diffraction analysis. Acta Cryst. 2012. F. 68. P. 1387-1389.
3. Н. Н. Мордкович, Т. А. Воейкова, Л. М. Новикова, И. А. Смирнов, В. К. Ильин, П. Е. Солдатов, А. Ю. Тюрин-Кузьмин, Т. С. Смоленская, В. П. Вейко, Р. С. Шакулов, В. Г. Дебабов. Влияние  $\text{NAD}^+$ -зависимой форматдегидрогеназы на анаэробное дыхание *Shewanella oneidensis* MR-1. Микробиология. 2013. Т. 82. №. 4. С. 395-401.
4. Н.Н. Мордкович, Т.Н. Сафонова, В.А. Манувера, В.П. Вейко, К.М. Поляков, К.С. Алексеев, С.Н. Михайлов, член-корр. РАН В.О. Попов. Физико-химическая характеристика уридинфосфорилазы из *Shewanella oneidensis* MR-1. Доклады Академии наук, 2013. Т. 451. №2. С. 225-227.
5. Н.Н. Мордкович, В.А. Манувера, В.П. Вейко. Исследование роли неорганических ионов и уридина в формировании четвертичной структуры уридинфосфорилаз. // Тезисы XXV Международная зимняя молодежная научная школа “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”, посвященная 30-летию Научно-образовательного центра ИБХ РАН, Москва, 11-15 февраля 2013, Сборник тезисов, стр. 64.
6. N.N. Mordkovich, V.A. Manuvera, V.P. Veiko. Investigation and using of the promoters of uridine phosphorylase genes from *Escherichia coli* (Eudp) and *Shewanella oneidensis* MR-1 (Sudp) in heterological expression. 7<sup>th</sup> conference on recombinant protein production, 6-8 March 2013, Laupheim, Germany. Abstract book p. 107.
7. T. Safonova, K. Polyakov, N. Mordkovich, V. Veiko, K. Alekseev, S. Michailov, V. Popov. Structure of uridine phosphorylase from *Shewanella oneidensis* MR-1 in the free state at atomic resolution and its structure in complex with the natural substrate. 38<sup>th</sup> Federation of European Biochemical societies congress. Mechanisms in Biology. 6-11 July 2013, St. Petersburg, Russia. FEBS J. 2013. V. 280 (supl.1). P. 133-134.
8. N. Mordkovich, T. Voeikova, L. Novikova, I. Smirnov, V. Ilyin, P. Soldatov, A. Tyurin-Kuz'min, T. Smolenskaya, V. Veiko, R. Shakulov, V. Debabov. Influence of  $\text{NAD}^+$ -dependent formate dehydrogenase to anaerobic respiration in *Shewanella oneidensis* MR-1. 5<sup>th</sup> Congress of European microbiologists, 21-25 July 2013, Leipzig, Germany. Abstract book p. 601.