Кристаллизация и предварительное рентгеноструктурное исследование уридинфосфорилазы из SHEWANELLA ONEIDENSIS

Сафонова Т.Н., Поляков К.М., Алексеев К.С, Бойко К.М., Попов В.О.

Учреждение Российской Академии Наук Институт Биохимии им. А.Н. Баха РАН, Учреждение Российской Академии Наук Институт Молекулярной Биологии им. В. А. Энгельгардта РАН

Уридинфосфорилаза (УФ, КФ 2.4.2.3) относится к классу пиримидиновых нуклеозидфосфорилаз и является ключевым ферментом пиримидинового обмена. Фермент катализирует расщепление C–N гликозидной связи в уридине с образованием урацила и рибозо-1´-фосфата. Осуществляя фосфоролиз пуриновых и пиримидиновых оснований, уридинфосфорилаза обеспечивает клетку предшественниками нуклеотидов. Уридинфосфорилаза была обнаружена в микроорганизмах и у различных млекопитающих, в том числе у человека. В опухолевых клетках наблюдается повышенный уровень активности нуклеозидфосфорилаз, которые могут быть использованы в качестве маркеров онкологических заболеваний. Уридинфосфорилаза играет важную роль в активации 5-фторурацила (антиметаболита урацила) [1], используемого при лечении раковых заболеваний, и пролекарства 5‘-дезокси-5-фторуридина. В опытах in vivo показано, что специфичные к уридинфосфорилазе ингибиторы усиливают лечебный эффект 5-фторурацила при лечении злокачественных новообразований [2]. Следовательно, можно уменьшить дозу вводимого антиметаболита пиримидиновых оснований, применяя ингибиторы, и таким образом снизить токсическое действие противоопухолевого агента на здоровые ткани. Кроме того, нуклеозидфосфорилазы используются в биотехнологии и медицине для синтеза противовирусных и противораковых препаратов, представляющих собой модифицированные нуклеотиды.

Для понимания механизма функционирования фермента необходимы детальные данные о трехмерной структуре УФ, в том числе о строении активного центра. Вышесказанное определяет большой интерес к изучению трехмерной структуры уридинфосфорилазы. Следует отметить, что УФ из Shewanella oneidensis (грамотрицательная, факультативно анаэробная бактерия рода Shewanella, обитающая предпочтительно на дне моря в анаэробных условиях) ранее не изучалась, ее трехмерная структура и кинетические параметры неизвестны.

Кристаллизация белков является сложной, зачастую весьма трудоемкой задачей с заранее непредсказуемым результатом. С целью получения кристаллов, пригодных для сбора рентгеноструктурных данных, был проведен поиск условий кристаллизации для уридинфосфорилазы из Shewanella oneidensis с использованием стандартных наборов для кристаллизации (скрининга) глобулярных белков компании Hampton Research. Кристаллизация проводилась методом висячей капли посредством диффузии в парах с использованием лиофильно высушенного препарата, растворенного в деионизированной воде (MilliQ) с концентрацией 20 мг/мл при комнатной температуре в термостатированной комнате. Раствор белка центрифугировали непосредственно перед кристаллизацией на микроцентрифуге в течение 10 минут со скоростью 18000 об/мин для удаления инородных частиц и агрегатов. Первые кристаллы появились через 2 недели. По результатам скрининга отбирались условия кристаллизации для последующей оптимизации. Лучшие кристаллы получены с использованием противораствора, содержащего 0.75 М сульфата аммония, 0.75% ПЭГ 3350, и 25% глицерина в 0.075 М Bis-Tris буфере. В результате проведенных исследований получены монокристаллы УФ, пригодные для рентгеноструктурного исследования, с размерами до 0.5 мм. В настоящее время проводятся работы, направленные на получение кристаллов УФ в комплексах с ингибиторами и субстратами методами сокристаллизации и настаивания кристаллов свободной УФ с соответсвующими лигандами.

Предварительное рентгеноструктурное исследование проведено с использованием синхротронного излучения при 100 К на станции белковой кристаллографии "Белок" в НИЦ «Курчатовский институт». Использовался кристалл с размерами 0.4 x 0.35 x 0.25 мм. Параметры элементарной ячейки a = b = 91.54 Å, c = 95.93 Å, гексагональная сингония (Лауэ класс P626262). Набор дифракционных данных собран с разрешением 1.8 Å. В настоящее время проводится работа по решению и уточнению трехмерной структуры УФ.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» Министерства образования и науки Российской Федерации (Государственный контракт № 16.512.11.2174).

Список литературы

1. Cao D., Russell R.L., Zhang D., Leffert J.J., Pizzorno G. (2002), Cancer Res., 62, 2313-2317
2. Iigo, M., Nishikata, K., Nakajima, Y., Szinai, I., Veres, Z., Szabolcs, A., De Clercq, E. (1990), Biochem. Pharmacol, 39, 1247-1253