

## 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 урдине с образованием урацила и рибозо-1-фосфата. Осуществляя фосфорилирование 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'-дезоксифторуридина. 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 вискозной капли посредством диффузии в парах с использованием 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 соответствующими 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