Предварительное рентгеноструктурное исследование мутантной формы (GLU43ALA/PHE81ALA) рибонуклеазы биназы из BACILLUS INTERMEDIUS

Поляков К.М., Трофимов А.А., Дороватовский П.В., Шульга А.А.

Учреждение Российской Академии Наук Институт Молекулярной Биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Центр «Биоинженерия» РАН

Внеклеточная рибонуклеаза из бактерий Bacillus intermedius (биназа; ЕС 3.1.27.3) содержит 109 аминокислотных остатков. Фермент катализирует расщепление одноцепочечной РНК за пуриновыми нуклеотидами. Биназа принадлежит к семейству микробных рибонуклеаз [1]. Ранее для биназы расшифрованы пространственные структуры свободного фермента, комплекса с сульфат ионом, комплекса с гуанозин 3´-фосфатом и структуры двух кристаллических модификаций мутантной формы Trp34Phe рибонуклеазы с разрешением 1.65, 2, 2, 1.7 и1.1 D, соответственно [2,3]. Во всех решенных ранее структурах рибонуклеазы биназы обнаружены димерные структуры. В этих димерных структурах только одна из двух молекул фермента может связывать молекулу субстрата. Активный центр одной из молекул в таком димере блокирован, так как боковая цепь Phe81 второй молекулы димера участвует в стэкинг взаимодействии с боковой цепью каталитического остатка Tyr102 первой молекулы димера и частично перекрывает область связывания гуанилового основания первой молекулы. Боковая цепь Arg58 первой молекулы развернута в сторону от активного центра и образует солевой мостик с боковой цепью Glu43 второй молекулы. Обнаружение димерной структуры в кристаллах, выросших при различных условиях, позволяет предположить возможность образования подобной структуры и в растворе. Целью настоящей работы является предварительное рентгеноструктурное исследование кристаллов мутантной формы (Glu43Ala/Phe81Ala) рибонуклеазы биназы, которая не способна образовывать описанную выше димерную структуру.

Система для бактериальной экспрессии гена биназы описана ранее [4]. Культивирование штаммов продуцентов мутанта (Glu43Ala/Phe81Ala) рибонуклеазы биназы, очистку и выделение препаратов мутантной формы (Glu43Ala/Phe81Ala) рибонуклеазы биназы проводили по методике описанной в [3].

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 мутантной формы (Glu43Ala/Phe81Ala) рибонуклеазы биназы 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 белка , растворенного в воде (MilliQ) с концентрацией 10 мг/мл при комнатной температуре. Кристаллы получены с использованием противораствора, содержащего 0.1 М лимонную кислоту (pH 3.5) и 3 М хлорид натрия.

Предварительное рентгеноструктурное исследование проведено с использованием синхротронного излучения при 100 K на станции белковой кристаллографии "Белок" в НИЦ «Курчатовский институт». Использовался кристалл с размерами 0.3 x 0.25 x 0.1 мм.

Перед проведением сбора дифракционных данных кристалл помещали на несколько секунд в криораствор следующего состава: 0.1 М лимонная кислота (pH 3.5), 3 М хлорид натрия и 25% глицерина. Кристаллы принадлежат к тетрагональной сингонии (Лауэ класс P4). Параметры элементарной ячейки равны: a=в=50.36 Å, c=196. 12 Å. Набор дифракционных данных собран с разрешением 1.89 Å. Дифракционные данные были обработаны по программе XDS [5].

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 № 16.512.11.2233).

Список литературы:

1. Hill C., Dodson G., Heinemann U., Saenger W., Mitsui Y., Nakamura K., Borisov S., Tischenko G., Polyakov K., Pavlovsky A. 1983.. Trends Biochem. Sci. 8, 364–369.

2. Polyakov K.M., Lebedev A.A., Okorokov A.L., Panov K.I., Shulga A.A., Pavlovsky A.G., Karpeisky M.Ya., Dodson G.G. 2002. Acta Crystallogr. Sect. D. 58, 744–750.

3. К. М. Поляков, Д. А. Гончарук, А. А. Трофимов, Т. Н. Сафонова, В. А. Митькевич, Е. Н. Ткач, А. А. Макаров, А. А. Шульга. 2010. Молекулярная биология, 44, 922–928.

4. Шульга А.А., Окороков А.Л., Панов К.И., Курбанов Ф.Т., Чернов Б.К., Скрябин К.Г., Кирпичников М.П. 1994. Молекулярная.биология. 28, 453–463.

5. Kabsch W. 2001. in International Tables for Crystallography. Eds Rossmann M.G., Arnold E. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, F, Chapter 25.2.9, 730–734.