

УДК 577.214.622 + 577.27 + 615.37

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДЫ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ ИЗ ПРОКАРИОТ**А.Н. Антипов, Н.Н. Мордкович, Н.А. Окорокова, Т.Н. Сафонова, К.М. Поляков, В.П. Вейко***ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

Нуклеозидфосфорилазы (NP) – ферменты, относящиеся к классу трансфераз, катализируют обратимый фосфоролиз нуклеозидов и их аналогов. Продуктами этой реакции являются соответствующие гетероциклические соединения (основания) и рибозо-(дезоксирибозо-) – 1-фосфат. NP подразделяются на два подкласса: NP1 (пурин-нуклеозидфосфорилазы, 5'-дезоксид-5'-метитиоаденозинфосфорилаза, уридинфосфорилаза) и NP2 (тимидинфосфорилаза, пиримидин-нуклеозидфосфорилаза). Данные ферменты присутствуют практически во всех высших организмах и микроорганизмах, включая экстремофильные (например, термофильные археи и бактерии). NP являются объектами пристального внимания исследователей, что предопределено тремя аспектами: 1. выявление молекулярного механизма функционирования этих ферментов; 2. разработка высокоспецифичных и эффективных ингибиторов самих NP, что необходимо при терапии многих заболеваний, включая и онкологические, у человека; 3. практическим использованием NP в ферментативном синтезе («зеленая химия») аналогов нуклеозидов, являющимися терапевтическими средствами. Не менее важным является выяснение принципов формирования термостабильных (ТС) форм NP, что может быть отнесено к фундаментальным знаниям. В работе на основе клеток *E.coli*, нами была сконструирована библиотека штаммов-продуцентов (16 вариантов) рекомбинантных NP, их мутантных и гибридных форм из различных мезофильных и экстремофильных микроорганизмов. Экспериментально показано, что субстраты стабилизируют структуру NP при термальном воздействии на эти белки. При этом именно неорганический фосфат-ион является решающим в этом процессе. С использованием биоинформатических методов анализа высказано предположение, что N-концевая структура белков во многом определяет термостабильность NP. Выявлено, что структура межсубъединичных контактов в этих мультисубъединичных белках влияет на термостабильность белков, но не является решающей при формировании толерантности нуклеозидфосфорилаз к температурному воздействию. Сконструирован гибридный белок тимидинфосфорилазы (TPP) из *E.coli*, в котором N-концевой фрагмент (1–62 аминокислотные остатки) заменен на соответствующий фрагмент из термостабильной TPP из *G.stearothermophilus*. Показано, что термостабильность полученной гибридной TPP повысилась примерно в 7 раз. В первичной структуре уридинфосфорилазы (UDP) из *E.coli* в N-концевой структуре выявлена аминокислотная последовательность 25-PGDP-30, высококонсервативная у UDP из мезофильных микроорганизмов. Сконструирована мутантная форма (D27G) UDP из *E.coli*, которая также обнаружила повышенную термостабильность (примерно в 11 раз) по сравнению с исходной формой. Получена кристаллическая форма этого мутантного белка и с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА, разрешение 1,75Å) раскрыты структурные особенности строения этого белка. Высказано предположение, что именно архитектура строения фосфат-связывающего сайта у уридинфосфорилаз и особенности его функционирования, имеют решающее значение в придании этому ферменту термостабильности. На основании полученных нами ранее данных РСА для UDP из *Shewanella oneidensis* MR-1, отмечены подвижные петлевые участки (159–173 и 236–226 аминокислотные остатки), принимающие участие в связывании неорганического фосфат-иона и формировании активного центра фермента. Эти фрагменты полипептидной цепи рассматриваются как мишени для дальнейшего исследования принципов образования термостабильных форм NP.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 18-04-00784).