



УДК 575.22.224:577.112

## ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ОСТАТКОВ ГИСТИДИНА В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ УРИДИНФОСФОРИЛАЗЫ ИЗ *Escherichia coli* K-12 МЕТОДАМИ БЕЛКОВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

© 1995 г. В. П. Вейко, З. З. Сипрашвили, К. И. Ратманова, Л. Б. Гулько

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции  
промышленных микроорганизмов, Москва

Поступила в редакцию 01.02.95 г.

С использованием сайт-направленного мутагенеза сконструированы мутантные формы гена уридинфосфоорилазы из *E. coli*, кодирующие белки с точечными заменами остатков гистидина: H8N, H47N, H101N, H122N, H152N, H179N и H240N. Изучение ферментативной активности мутантов уридинфосфоорилазы показало, что замены остатков His<sup>47</sup>, His<sup>101</sup>, His<sup>152</sup>, His<sup>179</sup> и His<sup>240</sup> на аспарагин не влияют на функционирование белка. Замены H122N и H8N снижают уридинфосфоорилазную активность на 60 и 100% соответственно, что свидетельствует о важной функциональной роли остатков His<sup>122</sup> и His<sup>8</sup> в формировании активного центра фермента.

*Ключевые слова:* сайт-направленный мутагенез; уридинфосфоорилаза; остатки гистидина, полимеразная цепная реакция; *Escherichia coli*.

Наличие в клетках *Escherichia coli* ферментативной системы катаболизма и транспорта нуклеозидов позволяет бактериальным клеткам расти на среде, содержащей нуклеозиды в качестве единственного источника углерода [1]. Первый этап катаболизма – расщепление β-N-гликозидной связи нуклеозида соответствующей нуклеозидфосфоорилазой и освобождение пуринового или пиримидинового основания и фосфата углевода. Одним из ферментов катаболизма нуклеозидов *E. coli*, осуществляющим обратимый фосфолиз уридина до урацила и рибоза-1-фосфата, является уридинфосфоорилаза (КФ 2.4.2.3). Ген уридинфосфоорилазы (*udp*) локализован на 85-й мин хромосомной карты *E. coli*, клонирован и определена его полная нуклеотидная последовательность [2]. Для уридинфосфоорилазы, выделенной из различных источников [3 - 5], показано, что фермент участвует в деградации некоторых аналогов пиримидиновых нуклеозидов, применяемых при лечении злокачественных опухолей, снижая тем самым химиотерапевтическое действие данных соединений [6, 7]. Изучение структурно-функциональной организации и механизма действия уридинфосфоорилазы имеет большое значение как для поиска высокоспецифических ингибиторов [8, 9], так и для создания модели ее пространственной организации.

Ранее нами была сконструирована рекомбинантная плазида и получен соответствующий штамм-продуцент, обеспечивающий высокий уровень накопления уридинфосфоорилазы в клетках *E. coli* [10].

Данная работа, являющаяся частью комплексного исследования структурно-функциональной организации уридинфосфоорилазы, направлена на выяснение роли остатков гистидина в функционировании фермента.

Уридинфосфоорилаза из *E. coli* K-12 состоит из шести одинаковых белковых субъединиц с молекулярной массой 27.5 кДа [11]. Аминокислотная последовательность субъединицы (253 а. о.) отличается высоким содержанием остатков аланина, глицина и валина (до 30%). В каждой субъединице уридинфосфоорилазы локализовано семь остатков гистидина в положениях 8, 47, 101, 122, 152, 179 и 240.

Известно, что в различных белках остатки гистидина непосредственно участвуют в каталитическом превращении субстрата [12, 13]. Первоначально роль гистидинов в уридинфосфоорилазе изучали при помощи химической модификации фермента [14]. Было показано, что в каждой субъединице белка модификации подвергаются три гистидиновых остатка, из которых только один важен для ферментативной активности. Однако ни один из этих остатков гистидина, включая функционально значимый остаток, локализован не был. Также оставалась невыясненной функциональная

Сокращения: H8N – направленная точечная мутация остатка гистидина 8 на аспарагин (аналогично другие мутации); PCR – полимеразная цепная реакция. Символ “d” в формулах дезоксирибоолигонуклеотидов опущен.

Ферментативная активность мутантных форм уридинфосфорилазы и олигонуклеотиды, использованные для их создания

Праймер	Структура мутагенных олигонуклеотидов 5' → 3'	Мутант	Аминокислотные замены	Активность фермента, %
(I)	T T T T G G A T C C A T G T C C A A G T C T G A T G T T T T A A T C T C G	1	H8N	0
(II)	G A A T T C G C G G T T A G A T G C C A G C	2	H47N	100
(III)	C A T T A A T A T T C G G C T G A A T A G C G	3	H101N	100
(IV)	G G T G C G A A G T T C A G G C T C G C	4	H122N	40
(V)	A C G C C A A C G T T A G T T G T C G C G	5	H152N	100
(VI)	C C T T T A A A G T T A C G A A C T A C	6	H179N	100
(VII)	T T T T C A C C G C A T T G C T T T C G G T T	7	H240N	100

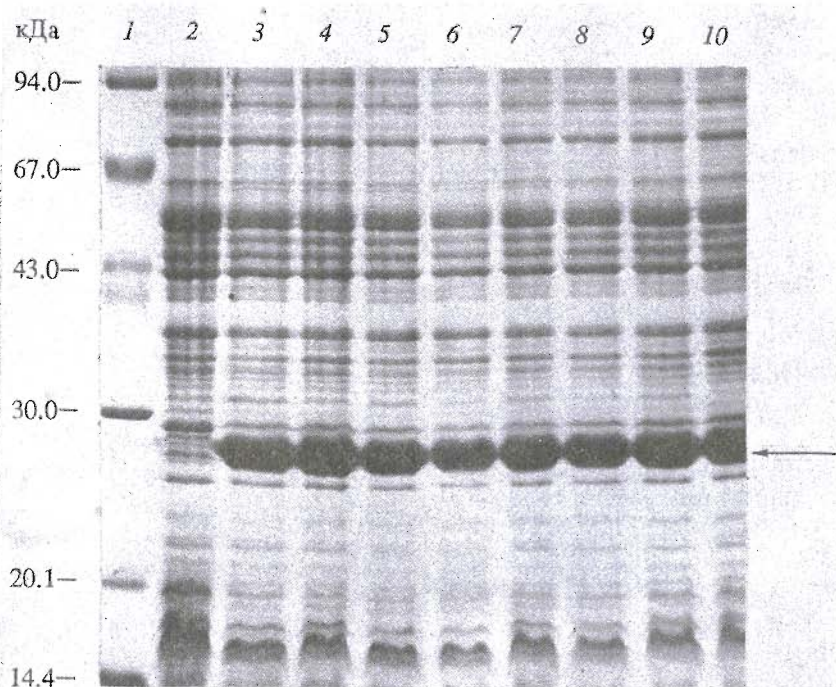
Примечание. За единицу активности фермента принято такое его количество, которое расщепляет 1 мкмоль уридина за 1 мин при 37°C [3]. За 100% принята удельная ферментативная активность уридинфосфорилазы дикого типа, составлявшая в экспериментах 130 ед./мг. Жирным шрифтом выделены кодоны, вызывающие направленный мутагенез.

роль остальных четырех остатков гистидина, входящих в состав белка.

В данной работе мы изучали влияние остатков гистидина в уридинфосфорилазе на ее ферментативную активность. Мутантные аллели гена *udp*, несущие точечные замены в составе гистидиновых кодонов, приводящие к их замене на аспарагиновые кодоны, конструировали при помощи сайт-направленного мутагенеза с применением PCR [15]. В работе использовали олигонуклеотиды (I) - (VII) (таблица), позволяющие вводить в

белок точечные мутации H8N, H47N, H101N, H122N, H152N, H179N и H240N. Мутантные аллели гена *udp* клонировали в плазмиду pUC18.

Анализ клеточных лизатов *E. coli*, несущих рекомбинантные плазмиды, показал, что введение в уридинфосфорилазу замен H8N, H47N, H101N, H122N, H152N, H179N и H240N не влияет на уровень накопления белка: мутантные формы гена уридинфосфорилазы экспрессируются на уровне дикой аллели (рисунок).



Электрофорез в 12.5% SDS-ПААГ лизатов культуры клеток *E. coli* C600, трансформированных плазмидой pUUDP (3) и этой же плазмидой с точечными мутациями гена *udp*, приводящими к аминокислотным заменам H8N (4), H47N (5), H101N (6), H122N (7), H152N (8), H179N (9), H240N (10); 1 – белки-маркеры, 2 – штамм-реципиент. Стрелкой показаны полосы, соответствующие уридинфосфорилазе.



Изучение мутантных форм уридинфосфорилазы показало, что замены H47N, H101N, H152N, H179N и H240N (таблица) не снижают ферментативной активности уридинфосфорилазы. Наряду с этим замены H8N (мутант 1) и H122N (мутант 4) приводят соответственно к полной и 60% потере уридинфосфорилазной активности. Полная потеря активности в результате замены H8N свидетельствует о важной функциональной роли остатка His<sup>8</sup>, что может быть связано с его непосредственным участием в формировании активного центра фермента. Результаты, полученные для мутанта 4, дают возможность предположить, что остаток His<sup>122</sup> выполняет важную структурную роль в поддержании активной формы уридинфосфорилазы.

Полученные результаты соответствуют ранее полученным данным [14] и позволяют локализовать один из функционально значимых остатков гистидина – His<sup>8</sup>, участвующий, по-видимому, в формировании активного центра уридинфосфорилазы.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали акриламид, агарозу, трис-основание, SDS, глицин, EDTA, ATP (Sigma, США); соли (Merck, Германия); набор белковых маркеров (Pharmacia, Швеция). Все остальные реактивы – отечественного производства квалификации х. ч. и ос. ч.

**Ферменты:** эндонуклеазы рестрикции *Sac*I, *Sal*GI (Biolabs, США); T4-ДНК-лигаза и T4-полинуклеотидкиназа, модифицированная T7-полимераза (Amersham, Англия), *Taq*-полимераза (НПО "Ферментас", Литва), РНКаза А (Sigma, США).

**Бактериальный штамм** *E. coli* 6600 (*thi thr leu Dpro-lac Δmet-udp recA*) получен из музея ГНИИ-генетика.

**Бактериальные клетки** культивировали при 37°C на среде Лурия (L-бульон) [16]. Твердые среды содержали 1.5% агара. Компоненты бактериальных сред – триптон, дрожжевой экстракт и агар – производства Difco (США). Для обеспечения селективного роста клеток применяли ампициллин (50 мкг/мл).

**Бактериальные плазмиды.** Использовали плазмиду pUUDP, сконструированную нами ранее [10], и pUC18, полученную из музея ГНИИ-генетика. Выделение плазмидной ДНК, приготовление компетентной культуры клеток *E. coli* и трансформацию проводили так, как описано в работе [16].

**Дезоксирибоолигонуклеотиды синтезировали** и выделяли согласно [17].

**Сайт-направленный мутагенез** для конструирования мутантных форм уридинфосфорилазы проводили с использованием PCR по методике [15]. Реакционная смесь (100 мкл) содержал 0.1 М

трис-НCl (pH 8.4), 3.2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2 мМ dNTP, 6 нг амплифицируемой ДНК-матрицы и 2.5 ед. акт. *Taq*-полимеразы. В качестве краевых праймеров использовали олигонуклеотид N<sub>удр</sub> – (5')TTTTGGATCCATGTCCAAGTCTG, гомологичный 5'-концу значащей цепи гена, и C<sub>удр</sub> – (5')TTTTGTCTGACTTACAGCAGACG, комплементарный 3'-концу значащей цепи гена. Амплификацию проводили в течение 25 циклов по программе (°C/мин): денатурация – 94/1, отжиг – 58/1, элонгация – 72/1. В случае использования олигонуклеотидов N<sub>удр</sub> и C<sub>удр</sub> предварительные 7 циклов амплификации отличались от последующих температурой отжига праймеров (40°C). Полученный фрагмент ДНК, несущий мутантный аллель гена *udp*, клонировали в мультикопийный вектор pUC18 и ген экспрессировали в штамме-реципиенте *E. coli* C600.

Первичную последовательность ДНК определяли по методу Сэнгера [18].

Белковый денатурирующий электрофорез проводили по Леммли [19].

Ферментативную активность уридинфосфорилазы определяли согласно методике [3].

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hammer-Jespersen K. // Metabolism of Nucleotides, Nucleosides and Nucleobases in Microorganisms / Ed. Manch-Petersen A. London, New York, San Francisco: Acad. Press, 1983. P. 203 - 258.
2. Walton L., Richards C.A., Elwell L.P. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 16. P. 6741 - 6744.
3. Leer J.C., Hammer-Jespersen K., Schwartz M. // Eur. J. Biochem. 1977. V. 75. P. 217 - 224.
4. Vita A., Amici A., Cacciamani T., Lanciotti M., Magni G. // J. Biochem. 1986. V. 5. P. 431 - 436.
5. Kouni M.H., Naguib F.N.M., Niedzwicki J.G., Iltzsch M.H., Sungman Cha. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 6081 - 6086.
6. Mukherjee K.L., Bochar J., Wentland D., Anstield F.G., Heidelberger C. // Cancer Res. 1963. V. 23. P. 49 - 66.
7. Iigo M., Nishikata K., Nakajima Y. // Biochem. Pharm. 1990. V. 39. P. 1247 - 1253.
8. Fardos N.M., Naguib F.N.M., Mahmoud H., Kouni M.H., Shih Hsi Chu, Sungman Cha. // Biochem. Pharm. 1987. V. 36. P. 2195 - 2201.
9. Martin D.S., Stoffi R.L., Sawyer R.C. // Cancer Chem. Pharm. 1989. V. 24. P. 9 - 14.
10. Вейко В.П., Супрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Андриюхина Р.В. // Докл. РАН. 1994. Т. 339. С. 1 - 3.
11. Cook W.J., Kasalka G.W., Hall W.W., Narayana S.V.L., Ealick S.E. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 2852 - 2853.
12. Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков. М.: Мир, 1982.
13. Mercier G.A., Osman R., Weinstein H. // Prot. Engin. 1988. V. 2. P. 261 - 270.

14. Drabikowska A.K., Wozniak G. // J. Biochem. 1990. V. 270. P. 319 - 323.
15. Baretino D., Feigenbutz M., Valearcel R., Stunnenberg H.G. // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 541 - 542.
16. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
17. Вейко В.П., Ратманова К.И., Осипов А.С., Буленков М.Т., Пугачев В.В. // Биоорг. химия. 1991. Т. 17. С. 685 - 689.
18. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463 - 5467.
19. Laemmli U. // Nature. 1970. V. 227. P. 680 - 685.

## Role of Histidine Residues in the Activity of Uridine Phosphorylase from *Escherichia coli* K-12 Studied by Protein Engineering Methods

V. P. Veiko, Z. Z. Siphashvili, K. I. Ratmanova, and L. B. Gul'ko

*State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, Russia*

**Abstract** – Using site-directed mutagenesis, mutant genes of the *E. coli* UDPase that coded proteins with point substitutions of histidine residues (i.e., H8N, H47N, H101N, H122N, H152N, H179N, and H240N) were constructed. Study of the enzymatic activity of mutant UDPases showed that histidine–asparagine substitutions at the positions 47, 101, 152, 179, and 240 do not affect protein functioning. Whereas H122N and H8N substitutions inhibit the activity of UDPase by 60 and 100%, respectively. This evidences the important functional role of the His<sup>122</sup> and His<sup>8</sup> residues for the formation of the active site of the enzyme.

*Key words:* site-directed mutagenesis, UDPase, histidine residues, polymerase chain reaction, *Escherichia coli*.