



УДК 577.152.242*3'112.088.3:577.217

БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ УРИДИНФОСФОРИЛАЗЫ ИЗ *Escherichia coli* K-12. I. КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ В *E. coli* ГЕНОВ УРИДИНФОСФОРИЛАЗ ИЗ *Klebsiella aerogenes* И *Salmonella typhimurium*

© 1998 г. В. П. Вейко[#], Д. В. Чеботаев, И. В. Овчарова, Л. Б. Гулько

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов, 113545, Москва, 1-й Дорожный пр., д. 1

Поступила в редакцию 07.10.97 г. Принята к печати 28.11.97 г.

Клонированы гены уридинфосфорилаз (*udp*) из *Klebsiella aerogenes* и *Salmonella typhimurium*, сконструированы экспрессионные плазмиды и созданы высокоэффективные штаммы-продуценты соответствующих белков. Изучены ферментативные свойства продуцируемых уридинфосфорилаз в сравнении с UP-азой из *Escherichia coli*. Методами олигонуклеотиднаправленного мутагенеза получены мутантные формы (D5E, D5N и D5A) UP-азы из *E. coli* и показано, что остаток Asp5 не играет существенной роли в формировании активной формы белка.

Ключевые слова: уридинфосфоорилаза, гены *udp*, сайт-направленный мутагенез, клонирование, ПЦР, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* и *Salmonella typhimurium*.

Уридинфосфоорилаза (UP-аза КФ 2.4.2.3) – фермент катаболизма нуклеозидов, осуществляющий в присутствии ортофосфата обратимый фосфоролит уридина до урацила и рибозо-1-фосфата. Этот белок входит в состав системы транспорта и утилизации нуклеозидов, позволяющей бактериальным клеткам расти на средах, содержащих нуклеозиды в качестве единственного источника углерода [1]. Интерес к исследованию молекулярных основ действия данного фермента, кроме получения фундаментальных знаний о его структурно-функциональной организации, вызван отмеченным в литературе высоким уровнем накопления UP-азы и тимидинфосфоорилазы в клетках злокачественных новообразований у человека [2]. Данные ферменты не только снижают терапевтический эффект применяемых в онкологии антипролиферативных препаратов нуклеозидной природы [3], но и, обладая ангиогенными свойствами (тимидинфосфоорилаза), способству-

ют метастазированию опухоли [4]. Изучение взаимосвязи структура–функция в UP-азе может существенно упростить дизайн высокоэффективных ингибиторов данного фермента, позволяющих подавить развитие и метастазирование опухоли.

Одним из способов выяснения роли фрагментов полипептидной цепи в функционировании фермента является сравнение аминокислотных последовательностей функционально родственных белков. Последующее использование рекомбинантной технологии, позволяющей конструировать гибридные белки, состоящие из отдельных частей данного фермента, выделенного из различных источников, во многом может способствовать выяснению особенностей его структурно-функциональной организации [5].

Ранее мы клонировали, определили нуклеотидную последовательность генов UP-аз (*udp*) из *Klebsiella aerogenes* 4140 (NCTC 9127) и *Salmonella typhimurium* LT 2 (*trpB4*) (номера доступа в EMBL Y13414 и Y13360 соответственно) и выявили ряд нуклеотидных вариаций в их структурной части, приводящих к различиям в аминокислотных последовательностях UP-аз (рис. 1).

Как следует из рис. 1, аминокислотные последовательности UP-аз из *S. typhimurium* и *K. aerogenes* имеют значительную гомологию с UP-азой

Сокращения: UP-аза – уридинфосфоорилаза; D5E, D5N, D5A – направленные точечные мутации остатка аспарагиновой кислоты-5 на глутаминовую кислоту, аспарагин и аланин соответственно (аналогично другие замены). Символ “d” в формулах дезоксирибоолигонуклеотидов опущен.

[#]Автор для переписки (e-mail: veiko@vnigen.msk.su).

	1	10	20	30	40	50	60
E. c.	MSKSDV	FHLGLTKNDL	QGATLAI	IVPGDP	rVEKIAALMDK	PVKLASHREFTT	WRAELDGK
S. t.	MSKSDV	FHLGLTKNDL	QGAqLAI	IVPGDPER	VEKIAALMDK	PVKLASHREFTS	WRAELDGK
K. a.	MSKSDV	FHLGLTKNDL	QGATLAI	IVPGDPER	VEKIAALMDK	PVKLASHREFTS	WRAELDGK
K. sp.	MSKSDV	FHLGLTKNDL	QGATLAI	IVPGDPER	VEKIAALMDK	PVKLASHREFTS	WRAELDGK
H. i.	miirrfi	MS-G-VFHLn	LTKaQLK	GATLAI	IVPGDPa	RsErIAkql	DnPefLtStREFTSWlgyInGq
		70	80	90	100	110	
E. c.		PVIVCSTGIGGP	STIAVEELA-QLGI--	RTFL--	RIGTTGAI	QPHINVG	DVLTASVRL
S. t.		aVIVCSTGIGGP	STIAVEELA-QLGI--	RTFL--	RIGTTGAI	QPHINVG	DVLTASVRL
K. a.		PVIVCSTGIGGP	STIAVEELA-hvGV--	RTFL--	RIGTTGAI	QPHINVG	DVLTtGsvRL
K. sp.		slIVCSTGIGGP	STIrVEELast	LGVdsRT-Ltp	RIGTTGAI	QPHINVG	DVLTASVRL
H. i.		PiVVCSTGIGGP	STIcVEELA-QLGV--	RTFL--	RIGTTGAI	QPHINVG	DVLI tTAaVRL
		120	130	140	150	160	170
E. c.		DGASLHFAP	lEFPVAD	FECTTA--	LVEAAKSIGAT	THVGV	TASSD
S. t.		DGASLHFAP	MEFPVAD	FaCTTA--	LVEAAKSIGAT	THVGV	TASSD
K. a.		DGASLHFAP	MEFPVAD	FaCTTA--	LVEAAKSIGAT	THIGV	TASSD
K. sp.		DGASLHFAP	MEFPVAV---	EtsTA	tragEAR	KSIGATT-	IGVTA-S
H. i.		DGASHHFv	PlEyPAVAn	FECTTA--	LynAAKak	GiepyVG	VtSSD
				180	190	200	210
E. c.		-----VVR	-----H	-----	FKGSMEEWQAM	GVMNYEMESa	TLLTMCASQ
S. t.		-----VVR	-----R	-----	FKGSMEEWQAM	GVMNYEMESr	TLLTMCASQ
K. a.		-----VVs	-----R	-----	FKGSMEEWQAM	GVMNYEMESa	TLLTMCASQ
K. sp.		ernsrshi	VRTlsilyqqq	tydtysr	verFKGSMEEWQAM	GVMNYEMESa	TVLTMCASQ
H. i.		-----VyR	-----n	-----	yqGllkqWQdln	VVMNYEMESs	TlTMCsaIG
		220	230	240	250		
E. c.		LRAGMVAG	VIVNRTQQE	IPNAETMKQTESH-	AVKIVVEAARRLL		
S. t.		LRAGMVAG	VIVNRTQQE	IPNAETMKQTESH-	AVKIVVEAARRLL		
K. a.		LRAGMVAG	VIVNRTQQE	IPNAETMKQTESH-	AVKIVVEAARRLL		
K. sp.		LRAGMVAG	VIVNRTQQE	IPNAETMKSTESQf	AVKIVVEAARRLL		
H. i.		LRAGMVAG	VIVNRTQQE	IPNEATIKQTEEK-	AVsvVi	tAAqaLLS	

Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей UP-аз из различных источников: E. c. – из *Escherichia coli* K-12 [6], S. t. – из *Salmonella typhimurium* LT 2 (данная работа), K. a. – из *Klebsiella aerogenes* 4140 (данная работа), K. sp. – из *Klebsiella species* LF 1202 [7], H. i. – из *Haemophilus influenzae* [8]. Порядковые номера аминокислотных остатков даны по последовательности UP-азы из *E. coli*. Строчными буквами обозначены несовпадающие аминокислотные остатки, прочерки введены для оптимизации выравнивания.

из *E. coli* K-12 (более 90%), однако в их структурах наряду с синонимическими (например, T52S, Q83H и L84V) присутствуют и несинонимические замены (T20Q, P61A, E135A, R178S, A200R).

Для исследования влияния выявленных замен на свойства фермента мы предприняли конструирование экспрессионных векторов и создание

штаммов-продуцентов данных ферментов. Конструирование проводили методом ПЦР с участием синтетических дезоксирибоолигонуклеотидов, структуры которых приведены в табл. 1.

Олигонуклеотиды (1), (2) и (3), (4) обеспечивали амплификацию структурной части генов UP-аз (*udp*) из *K. aerogenes* и *S. typhimurium* соответст-

венно непосредственно с хромосомной ДНК с одновременным введением сайтов эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Sal*GI. После очистки препаративным гель-электрофорезом в агарозе полученные фрагменты ДНК были клонированы в составе вектора pUU18. Ранее нами было показано, что этот вектор обеспечивает эффективную экспрессию в *E. coli* генов как про-, так и эукариотов [9, 10].

После подтверждения нуклеотидных последовательностей клонированных фрагментов ДНК полученными рекомбинантными плазмидами (pSUDP и pKUDP) трансформировали штамм *E. coli* С600 (см. "Экспериментальную часть"). Исследование уровня накопления фермента (рис. 2) в полученных штаммах-продуцентах показало, что эффективность биосинтеза UP-аз из *K. aerogenes* и *S. typhimurium* достаточно высока и сравнима с таковой для UP-азы из *E. coli*.

UP-аза из *E. coli* К-12 представляет собой шестисубъединичный белок с молекулярной массой одной субъединицы 27.5 кДа [11]. Шестисубъединичность полученных UP-аз из *S. typhimurium* и *K. aerogenes* подтверждали методом электрофореза в 12.5% неденатурирующем ПААГ. В качестве контроля использовали очищенную UP-азу из *E. coli* (рис. 3). В целом можно утверждать, что изучаемые ферменты, так же как и UP-аза из *E. coli*, формируют гексамерную структуру, хотя и наблюдается некоторое уменьшение их подвижности по сравнению с UP-азой из *E. coli*. Таким образом, обнаруженные аминокислотные замены не сказываются на четвертичной структуре исследуемых белков.

Чтобы проанализировать влияние выявленных аминокислотных замен на активность ферментов, нами были получены их основные каталитические характеристики, суммированные в табл. 2.

Интересно (табл. 2), что при сохранении значения pH-оптимума происходит резкое увеличение удельной активности в ряду UP-аз из *E. coli*, *K. aerogenes*, *S. typhimurium*, коррелирующее с уменьшением величины K_m по фосфату и относительным уменьшением сродства к другому субстрату – уридину, причем UP-аза из *K. aerogenes* занимает здесь промежуточное положение, так же как и по качеству произошедших изменений в ее первичной структуре (рис. 1). Однако отмеченные замены не приводят к возрастанию ферментативной активности по отношению к 2'-дезоксиривидину (табл. 2) в отличие от UP-азы из *Klebsiella species* LF 1202 [12], для которой этот показатель составлял 41.5%.

Ранее мы показали [13], что участок Pгоb1 – Pго72 полипептидной цепи UP-азы *E. coli* функционально важен, и предположили, что он формирует так называемую петлю Россмана, принимаю-

Таблица 1. Синтетические дезоксирибоолигонуклеотиды, использованные при клонировании генов UP-аз (*udp*) из *K. aerogenes* и *S. typhimurium*

Номер праймера	Структура дезоксирибо-олигонуклеотидов 5' → 3'
(1)	<i>Bam</i> HI TTTTGGATCCATGTCCAAGTCTG
(2)	<i>Bam</i> HI TTTTGGATCCTTACAGCAGACG
(3)	<i>Bam</i> HI TTTTGGATCCATGTCCAAGTCTG
(4)	<i>Sal</i> GI TTTTGTCTGACTTACAGCAGACG

Примечание. Жирным шрифтом выделены нуклеотидные последовательности сайтов эндонуклеаз рестрикции.

щую участие в связывании одного из субстратов – неорганического фосфата. Проведенный позже рентгеноструктурный анализ (РСА) UP-азы из *E. coli* [14] подтвердил, что данный участок действительно формирует петлевую структуру. Однако, так как РСА был выполнен в отсутствие субстратов, прямого доказательства связывания иона фосфата именно в этом участке получено не было. Нами также было показано [15], что остаток Cys65, входящий в состав этого участка полипептидной цепи, не несет функциональной нагрузки: замена С65S не приводила к изменению ферментативной активности. Следует также отметить высокую степень гомологичности этого участка полипептидной цепи в ряду всех рассмат-

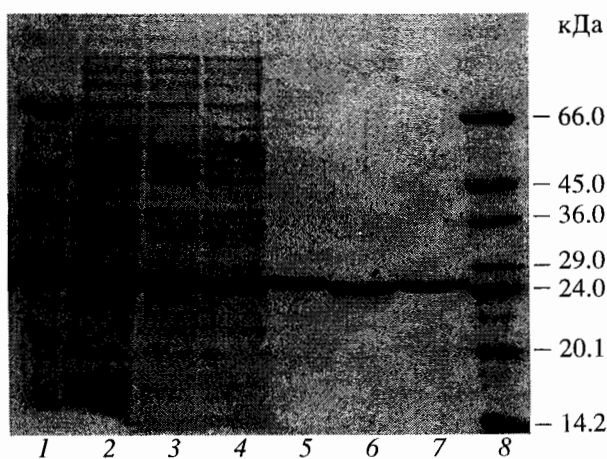


Рис. 2. Электрофоретическое разделение в денатурирующем ПААГ белков клеточных лизатов *E. coli* С600, трансформированных плазмидами: pUUDP (2), pSUDP (3), pKUDP (4); 5, 6, 7 – выделенные UP-азы из *E. coli*, *K. aerogenes* и *S. typhimurium* соответственно. 1, 8 – белки-маркеры.

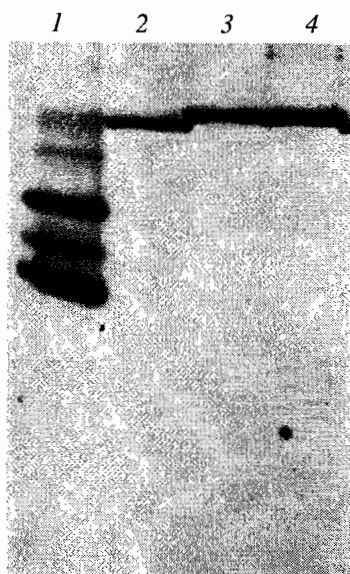


Рис. 3. Электрофоретический анализ UP-аз из *E. coli* (2), *K. aerogenes* (3) и *S. typhimurium* (4) соответственно в неденатурирующем ПААГ. 1 – белки-маркеры (снизу вверх: 12, 29, 66 кДа).

риваемых UP-аз (рис. 1), а также других аналогичных ферментов [16, 17].

Гидратированный фосфат – слабый нуклеофил и для увеличения нуклеофильности требует предварительной активации десольватацией. Замены, обеспечивающие возрастание внутренней конформационной подвижности, а также подвижности “петли Россмана” в целом и, как следствие, облегченное проникновение фосфата в гидрофобную зону активного центра фермента, могут приводить к изменению его активности. Повидимому, именно замена Р61А, уменьшающая конформационную заторможенность петлевого участка, и приводит к увеличению эффективности связывания фосфат-иона в случае UP-азы из *S. typhimurium*.

Не менее интересен факт замены Cys136 в составе UP-азы из *K. species* LF 1202 [7] (рис. 1). Ранее мы также показали, что остаток Cys136 ва-

жен для UP-азы из *E. coli* [13, 15]. Так, введение замены С136S вызывало полную деградацию фермента протеиназами *E. coli*. Последующая мутация S136D восстанавливала выход биосинтетического белка, находящегося в неактивной форме. Более того, нами показано [13, 15], что для функционирования UP-азы из *E. coli* важны и аминокислотные остатки, непосредственно окружающие Cys136. Поэтому произошедшая в UP-азах из *K. aerogenes* и *S. typhimurium* по сравнению с UP-азой из *E. coli* несинонимическая замена E135A, уничтожающая ω-кислотную функцию аминокислотного остатка, может иметь серьезные последствия для протекания ферментативного катализа, особенно если предполагать участие остатка Cys136 в стабилизации “переходного состояния” в фермент-субстратном комплексе. Анализ аминокислотных последовательностей (рис. 1) показывает, что в случае *K. species* LF 1202 белок “компенсирует” отсутствие Cys136 инсерцией достаточно протяженного участка полипептидной цепи.

Таким образом, вышеперечисленные вариации в аминокислотных последовательностях анализируемых UP-аз могут приводить к отмеченным различиям в свойствах этих ферментов. Полученные в дальнейшем с применением гибридной техники и сайт-направленного мутагенеза белки с такими заменами рассматриваются нами как объекты для дальнейших исследований.

Как видно из рис. 1, наибольшее число замен сосредоточено в N-концевой части белков. Действительно, в наиболее отличающемся по структуре ферменте (UP-аза из *Haemophilus influenzae*) имеются участки (остатки 61–120 и 211–240) аминокислотной последовательности белка, практически полностью идентичные соответствующим участкам других UP-аз, а также участок полипептидной цепи высокой степени негомологии (остатки 1–60). Ранее методом сайт-направленного мутагенеза мы показали, что именно в этом участке локализован остаток His8, входящий в активный центр UP-азы из *E. coli* [18], и важный для формирования функциональной молекулы оста-

Таблица 2. Свойства UP-аз из *S. typhimurium* и *K. aerogenes* в сравнении с UP-азой из *E. coli*

UP-аза	pH _{опт}	K _m , мМ		Активность	
		Urd	P _i	удельная*, ед. акт./мг	относительная (2' dUrd)**, %
<i>E. coli</i>	7.3	0.12	7.69	55 ± 4	5.8
<i>K. aerogenes</i>	7.3	0.15	7.21	98 ± 7	8.4
<i>S. typhimurium</i>	7.3	0.20	5.02	129 ± 9	7.5

* За 1 ед. активности фермента принято такое его количество, которое расщепляет 1 мкмоль уридина за 1 мин при 25°C.

** При определении относительной активности (субстрат – 2'-дезоксидеозин) за 100% принимали активность соответствующего фермента при фосфорилизе уридина.

Таблица 3. Структуры синтетических дезоксирибоолигонуклеотидов, использованных при изучении роли остатка Asp5 в функционировании UP-азы из *E. coli*, и ферментативная активность мутантных форм белка

Номер праймера	Структура дезоксирибоолигонуклеотидов 5' → 3'	Вносимая замена	Активность, %
(5)	TTTTGGATCCATGTCCAAGTCTGAAGTTT	D5E	100
(6)	TTTTGGATCCATGTCCAAGTCTAATGTTT	D5N	100
(7)	TTTTGGATCCATGTCCAAGTCTGCTGTTT	D5A	100

Примечание. Жирным шрифтом выделены кодоны, вызывающие направленный мутагенез.

ток Ala19 [13]. Другими авторами [19] с использованием химической модификации белка (реактив Вудворда К) в этом же участке идентифицирован остаток Asp5, который, по их мнению, также входит в состав активного центра фермента. Однако сравнение аминокислотных последовательностей (рис. 1) показывает, что при сохранении важных для функционирования белка остатков His8 и Ala19 (инвариантны в ряду рассматриваемых ферментов) в UP-азе из *H. influenzae* остаток Asp5 делегирован и это не сказывается на ферментативной активности белка. Более того, следует отметить, что в состав UP-азы из *E. coli* входят 28 остатков дикарбоновых аминокислот (11 остатков аспарагиновой и 17 глутаминовой), а применяемый для химической модификации [19] реактив Вудворда К не может быть, по нашему мнению, отнесен ни к числу аффинных реагентов, моделирующих субстрат (уридин или фосфат-ион), ни даже к числу строго селективных реагентов. Все эти данные поставили перед нами задачу дополнительного исследования роли остатка Asp5 в функционировании фермента.

Согласно данным работы [18], методом сайт-направленного мутагенеза с использованием олигонуклеотидов (5) – (7) (табл. 3) в состав аминокислотной последовательности UP-азы из *E. coli* были введены точечные мутации D5E, D5N и D5A. Экспрессию мутантных аллелей гена UP-азы (*udp*) проводили в клетках штамма *E. coli* C600 (см. “Экспериментальную часть”), трансформированных соответствующими плазмидами.

Результаты измерения ферментативной активности полученных мутантных форм белка (табл. 3) показали, что введение замены D5E (синонимическая замена) не изменяет активность, т.е. такая замена не нарушает правило взаимодействия фермент – субстрат (“ключ – замок”). Однако и несинонимические замены (D5N и D5A) не приводили к изменению ни активности фермента, ни уровня его накопления в *E. coli*.

Полученные результаты указывают на то, что аминокислотный остаток Asp5 в отличие от остатков His8 и Ala19 не играет существенной роли в формировании активного мультимерного комплекса белка и, тем более, не входит в состав ак-

тивного центра UP-азы из *E. coli*, а полученные ранее методом химической модификации данные являются скорее всего результатом неспецифических взаимодействий реактива Вудворда К и белка в процессе химической модификации. Следует отметить, что данная ситуация не уникальна. Например, в работе [20] также отмечается несоответствие результатов химической модификации и сайт-направленного мутагенеза. К аналогичному осторожному отношению к трактовке результатов химической модификации белков призывает и монография [21].

Таким образом, в данной работе клонированы гены UP-азы (*udp*) из *K. aerogenes* и *S. typhimurium*, сконструированы экспрессионные плазмиды и на их основе созданы высокоэффективные штаммы-продуценты *E. coli* соответствующих белков. Изучены ферментативные свойства UP-аз из *K. aerogenes* и *S. typhimurium* в сравнении с UP-азой из *E. coli*. Методами олигонуклеотид-направленного мутагенеза получены мутантные формы (D5E, D5N и D5A) UP-азы из *E. coli* K-12 и показано, что остаток Asp5 не играет существенной роли в формировании активной формы белка.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали агарозу, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, трис-основание, SDS, глицин, EDTA, АТФ, уридин, 2'-дезоксирин, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (Sigma, США); соли (Merck, Германия); набор белковых маркеров (Pharmacia, Швеция). Все остальные реактивы – отечественного производства квалификации х. ч. и ос. ч.

Ферменты: эндонуклеазы рестрикции BamHI, SalGI (Biolabs, США), T4-ДНК-лигаза и T4-поли-нуклеотидкиназа, модифицированная T7-полимераза (Amersham, Англия), Taq-полимераза (НПО “Фермент”, Литва), РНКаза А, дезоксинуклеозидтрифосфаты (Sigma, США).

Бактериальный штамм *E. coli* C600 (*thi, thr, leu, Δpro-lac Δmet-udp recA*) получен из музея ГНИИ “Генетика”.

Бактериальные клетки культивировали при 37°C на среде Лүрия (L-бульон) [22]. Твердые сре-

ды содержали 1.5% агара. Компоненты бактериальных сред – триптон, дрожжевой экстракт и агар – производства Difco (США). Для обеспечения селективного роста клеток применяли ампициллин (100 мкг/мл).

Бактериальные плазмиды. Использовали плазмиды рUU18, сконструированную нами ранее [9], и рUC18, полученную из музея ГНИИ “Генетика”. Выделение плазмидной ДНК, приготовление компетентной культуры клеток *E. coli* и трансформацию проводили как описано в работе [22].

Дезоксирибоолигонуклеотиды синтезировали и выделяли согласно работе [23].

Сайт-направленный мутагенез для конструирования мутантных форм УР-азы проводили с использованием ПЦР по схеме, описанной в работе [18].

Первичную последовательность ДНК определяли по методу Сэнгера [24].

Очистку УР-азы проводили согласно работе [12]. В случае УР-азы из *E. coli* К-12 использовали полученный нами ранее штамм-продуцент *E. coli* С600 рUUDP [15].

Белковый электрофорез проводили по Лэммли [25]. Концентрацию растворов белков определяли по Брэдфорду [26].

Ферментативную активность УР-азы определяли спектрофотометрически, непрерывно измеряя разницу в поглощении уридина (2'-дезоксиуридина) и образующегося урацила при 280 нм (25°C) [27]. Реакционная смесь содержала в общем объеме 2 мл: 50 мМ фосфат (рН 7.2), 0.5 мМ уридин (2'-дезоксиуридин), клеточный экстракт или раствор очищенного фермента (5–10 мкл). Для расчетов использовали $\Delta E = 2.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [28].

Константу Михаэлиса по уридину определяли, изменяя концентрацию уридина в реакционной смеси от 1 до 0.01 мМ при постоянной концентрации фосфата 50 мМ при рН 7.2.

Константу Михаэлиса по фосфату определяли при концентрации уридина, равной 0.5 мМ. Количество фосфата в реакционной смеси меняли от 2.5 до 50 мМ при рН 7.2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hammer-Jespersen K. // Metabolism of Nucleotides, Nucleosides and Nucleobases in Microorganisms / Ed. A. Munch-Petersen. London, New York, San Francisco: Acad. Press, 1983. P. 203–258.
2. Luccioni C., Beaumatin J., Bardot V., Lefrancois D. // Int. J. Cancer. 1994. V. 58. P. 517–522.
3. Ashour O.M., Nagiub F.N.M., Khalifa M.M.A., Abdel-Raheem M.H., Panzica R.P., Kouni M.H. // Cancer Res. 1995. V. 55. P. 1092–1098.
4. Maeda K., Chung Y.-S., Ogawa Y., Takatsuka S., Kang S.-M., Ogawa M., Sawada T., Onoda N., Kato Y., Sowa M. // Br. J. Cancer. 1996. V. 73. P. 884–888.
5. Шехтер И.И., Ратманова К.И., Вейко В.П., Дебабов В.Г. // Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. С. 379–386.
6. Walton L., Richards C.A., Elwell L.P. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 16. P. 6741–6744.
7. Takehara M., Ling F., Izawa S., Inoue Y., Kimura A. // Biosci. Biotech. Biochem. 1995. V. 59. P. 1987–1990.
8. Fleischmann R.D., Adams M.D., White O., Clayton R.A., Kirkness E.F., Kerlavage A.R., Bult C.J., Tomb J.-F., Dougherty B.A. // Science. 1995. V. 269. P. 449–604.
9. Вейко В.П., Осипов А.С., Шехтер И.И., Буленков М.Т., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Чибискова Н.А., Эррайс Л.Л., Дерезицкова Е.Б., Дебабов В.Г. // Биоорганич. химия. 1995. Т. 21. С. 354–358.
10. Вейко В.П., Супрашвили З.З., Гулько Л.Б., Ратманова К.И., Андрюхина Р.В. // Биотехнология. 1994. № 4. С. 2–4.
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. Ling F., Inoue Y., Kimura A. // Proc. Biochem. 1994. V. 29. P. 355–361.
13. Вейко В.П., Супрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Миронов А.А., Андрюхина Р.В., Дебабов В.Г. // Докл. РАН. 1994. Т. 339. С. 819–821.
14. Моргунова Е.Ю., Михайлов А.М., Комиссаров А.А., Мао Ч., Линькова Е.В., Миронов А.С., Попов А.Н., Армстронг С., Бурлакова А.А., Романова Д.В., Благова Е.В., Смирнова Е.А., Дебабов В.Г., Илик С.А. // Кристаллография. 1995. Т. 40. С. 672–680.
15. Вейко В.П., Супрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Миронов А.А. // Молекуляр. биология. 1996. Т. 30. Вып. 1. С. 170–177.
16. Watanabe S.-I., Uchida T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. V. 216. P. 265–272.
17. Watanabe S.-I., Hino A., Wada K., Eliason J.F., Uchida T. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 12191–12196.
18. Вейко В.П., Супрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б. // Биоорганич. химия. 1995. Т. 21. С. 834–837.
19. Komissarov A.A., Romanova D.V., Debabov V.G. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 10050–10055.
20. Kanaya S., Kimura S., Katsuda C., Ikehara M. // Biochem. J. 1990. V. 271. P. 59–66.
21. Степанов В.М. Структура и функции белков: М.: Высшая школа, 1996. С. 180–183.
22. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984.
23. Вейко В.П., Ратманова К.И., Осипов А.С., Буленков М.Т., Пугачев В.В. // Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. С. 685–689.
24. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
25. Laemmli U. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
26. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 2. P. 248–254.
27. Vita A., Amici A., Cacciamani T., Lanciotti M., Magni G. // J. Biochem. 1986. V. 5. P. 431–436.
28. Leer J.C., Hammer-Jespersen K., Schwartz M. // Eur. J. Biochem. 1977. V. 75. P. 217–224.

**Protein Engineering of Uridine Phosphorylase from *Escherichia coli* K-12.
I. Cloning and Expression in *E. coli* of Genes for Uridine Phosphorylases
from *Klebsiella aerogenes* and *Salmonella typhimurium***

V. P. Veiko[#], D.V. Chebotarev, I. V. Ovcharova, and L. B. Gul'ko

*State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms,
Pervyi Dorozhnyi proezd 1, Moscow, 113545 Russia*

Genes of uridine phosphorylases (*udp*) from *Klebsiella aerogenes* and *Salmonella typhimurium* were cloned and expressed. Highly effective producer strains of the corresponding proteins were constructed. Enzymic properties of the UPases obtained were studied and compared with those from the *Escherichia coli* enzyme. Mutant forms of UPase from *E. coli* (D5E, D5N, D5A) were prepared by site-directed mutagenesis techniques. It was shown that the Asp5 residue plays an insignificant role in the formation of the active form of the protein.

Key words: uridine phosphorylase, udp genes, site-directed mutagenesis, cloning, PCR, Escherichia coli, Klebsiella aerogenes, Salmonella typhimurium

[#] To whom correspondence should be addressed (e-mail: veiko@vnigen.msk.su).