



УДК 577.152.242*3.03:577.112.017

БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ УРИДИНФОСФОРИЛАЗЫ *Escherichia coli* K-12 II. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ГИБРИДНЫХ И МУТАНТНЫХ ФОРМ УРИДИНФОСФОРИЛАЗ

© 2001 г. Д. В. Чеботаев, Л. Б. Гулько, В. П. Вейко[#]ГУП Государственный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов,
Москва, 113545, 1-й Дорожный пр., д. 1

Поступила в редакцию 24.10.2000 г. Принята к печати 28.12.2000 г.

Созданы гены гибридных уридинфосфорилаз (UP-аз), состоящих из фрагментов аминокислотных последовательностей UP-аз *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*. Сконструированы генно-инженерные штаммы-продуценты соответствующих белков. Методами олигонуклеотиднаправленного мутагенеза получены мутантные формы UP-азы *E. coli* K-12. Проведено сравнительное изучение ферментативных свойств мутантных и гибридных форм бактериальных UP-аз. Показано, что остаток Asp27 UP-азы *E. coli*, в отличие от остатков Asp5 и Asp29, входит в состав активного центра белка. Предложена схема участия остатка Asp27 в связывании неорганического фосфата.

Ключевые слова: уридинфосфорилаза; сайт-направленный мутагенез; ПЦР; ген *udp*.

ВВЕДЕНИЕ

Уридинфосфорилаза (UP-аза, КФ 2.4.2.3) – фермент катаболизма нуклеозидов, осуществляющий обратимый фосфоролитический распад уридина до урацила и рибозо-1-фосфата [2]. Обнаружено возрастание содержания этого фермента в клетках злокачественных новообразований у человека [3], где он участвует в деградации *in vivo* некоторых антипролиферативных соединений – аналогов пиримидиновых нуклеозидов, снижая эффективность их химиотерапевтического действия [4].

К настоящему времени клонирован ряд генов UP-аз (*udp*) из различных про- и эукариотических организмов и частично или полностью определены их нуклеотидные последовательности. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей UP-аз из разных источников показал их значительную гомологию [1, 5].

В предыдущем сообщении [1] нами описано клонирование и определение нуклеотидных последовательностей генов *udp* из *Klebsiella aerogenes* 04140 (NCTC 9127) и *Salmonella typhimurium* LT 2 (*trpB4*), осуществлено конструирование генно-инженерных штаммов-продуцентов соответ-

ствующих белков, выделение белков и их функциональная характеристика. Было показано, что функциональные олигомеры обеих бактериальных UP-аз сформированы шестью идентичными субъединицами с *M* 27.5 кДа каждая. Аминокислотные последовательности исследованных белков (оба длиной 253 а. о.) обнаружили 90% гомологии с UP-зой *E. coli*, однако в их структурах присутствовал ряд природных замен (T20Q, R61A, E135A, R178S, A200R и др.). Вариации в аминокислотных последовательностях бактериальных UP-аз приводят к различиям в их ферментативных свойствах. Цель настоящей работы, используя полученные ранее результаты, локализовать функционально важные участки и аминокислотные остатки полипептидной цепи UP-азы *E. coli*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для решения поставленной задачи нами были получены два гибридных аллеля гена *udp*: *es1* и *es2*, кодирующие полипептиды UP-азы *E. coli* K-12, в которых N-концевые фрагменты замещены на соответствующие участки полипептидной цепи UP-азы из *S. typhimurium* длиной 43 а. о. (ES1) и 72 а. о. (ES2) (рис. 1). Как было показано нами ранее [6, 7], в состав именно этих областей UP-азы *E. coli* входят отдельные аминокислотные остатки (His8, Ala19) и фрагмент полипептидной цепи Pro61–Pro72, важные для функциональной активности.

Сообщение I см. [1].

Сокращения: PNP-аза – пуридиннуклеозидфосфорилаза; D27G – направленная точечная замена остатка аспарагиновой кислоты 27 на глицин (аналогично другие замены). Символ “d” в аббревиатуре дезоксирибоолигонуклеотидов опущен.

[#] Автор для переписки (e-mail: veiko@genetika.ru).

Ферментативная активность гибридных UP-аз (ES1 и ES2) и мутантных форм UP-азы *E. coli* K-12, полученных методом олигонуклеотиднаправленного мутагенеза

Олиго- нуклеотид	Структура деоксирибоолигонуклеотида* 5' → 3'	Наименование гибридной или мутантной формы UP-азы	pH _{опт}	K _{mmut} /K _{mwt} **		Активность отн.***
				Urd	P _i	Urd
–	–	UP-аза <i>E. coli</i>	7.3	1.0	1.0	100
(1)	ТТААССGGGCTTATCCATCAG	ES1	7.2	0.9	1.0	217
(2)	ACGGGCCACCGATACC	ES2	7.1	0.9	0.7	193
(3)	TCCACACGAGTCGGGTCCG	D29T	6.8	1.6	2.0	110
(4)	CGATCCGGGCGCCAGGG	D27G	7.1	6.7	8.5	23
(5)	TTTTGGATCCATGTCCAAGTCTGCTGTTT	D5A	6.8	0.4	0.4	76

* Жирным шрифтом выделены кодоны, вызывающие направленные мутации.

** K_{mmut}/K_{mwt} – отношение констант Михаэлиса, определенных по уридину (Urd) и фосфату (P_i), для мутантных (или гибридных) UP-аз и нативной UP-азы *E. coli*.

*** За 1 ед. активности фермента принято такое его количество, которое расщепляет 1 мкмоль уридина за 1 мин при 25°C. При измерении относительной активности по уридину за 100% принимали удельную ферментативную активность UP-азы *E. coli* K-12 дикого типа, составлявшую в экспериментах 55 ед. акт./мг [1].

Оба конструирования проводили методом двухстадийной ПЦР. В качестве исходной матрицы брали плазмиду pSUDP, созданную нами ранее [1], несущую структурную часть гена *udp* из *S. typhimurium*. На первой стадии с использованием олигонуклеотидов (1) и (2) (таблица) нами были получены фрагменты ДНК, имеющие в своем составе участки гена *udp* из *S. typhimurium*, кодирующие N-концевые области соответствующей UP-азы длиной 72 и 43 а. о. На второй стадии конструирования полученные фрагменты ДНК использовались как мегапраймеры и достраивались по матрице гена *udp E. coli* K-12.

Созданные в результате фрагменты ДНК, включающие полноразмерные гибридные аллели *es1* и *es2*, клонировали в мультикопийный вектор pUC18 по сайтам эндонуклеаз рестрикции *SalGI* и *SacI*. Полученными рекомбинантными плазмидами pES1 и pES2 трансформировали штамм-реципиент *E. coli* С600 (см. “Эксперимент. часть”).

Ранее нами были получены ряд плазмид на основе pUC18: pUU18 [8], содержащая регуляторную область гена *udp E. coli*, pUUDP с полноразмерным геном *udp E. coli*, pKUDP и pSUDP со структурными частями генов *udp K. aerogenes* и *S. typhimurium* [1].

Мы провели сравнительный электрофоретический анализ общих лизатов клеток штамма-реципиента *E. coli* С600, трансформированных сконструированными в данной работе (pES1 и pES2) и ранее (pUU18, pUUDP, pKUDP, pSUDP) плазмидами. Он выявил, что уровень накопления гибридных белков ES1 и ES2 сопоставим с таковым для UP-аз *E. coli* K-12 и *S. typhimurium* (рис. 2). Таким образом, нами были созданы штаммы-производители гибридных белков.

Далее гибридные белки ES1 и ES2 были очищены в соответствии с работой [9] и проанализированы электрофорезом в неденатурирующих условиях. Как видно на рис. 3, искусственно созданные ферменты сохраняют гексамерную структуру, характерную, в соответствии с работами [1, 10], и для природных бактериальных UP-аз.

Далее мы исследовали кинетические характеристики гибридных белков с целью определения степени влияния замен T20Q, D29E (ES1) и T20Q, D29E, T52S, P61A (ES2) (обозначены на рис. 1) на различия в свойствах бактериальных UP-аз.

Как видно из таблицы, искусственно созданные UP-азы показали возрастание ферментативной активности. При этом сродство к субстратам

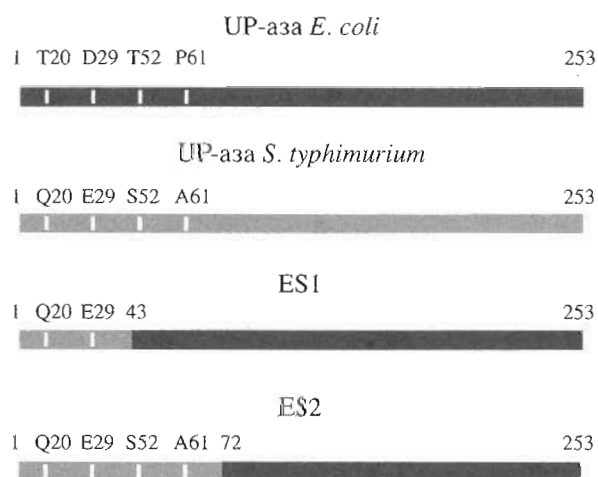


Рис. 1. Схема организации полипептидных цепей UP-аз *E. coli* и *S. typhimurium*, а также гибридных UP-аз ES1 и ES2. Обозначены остатки в N-концевой области, важные для UP-аз *E. coli* и *S. typhimurium*.

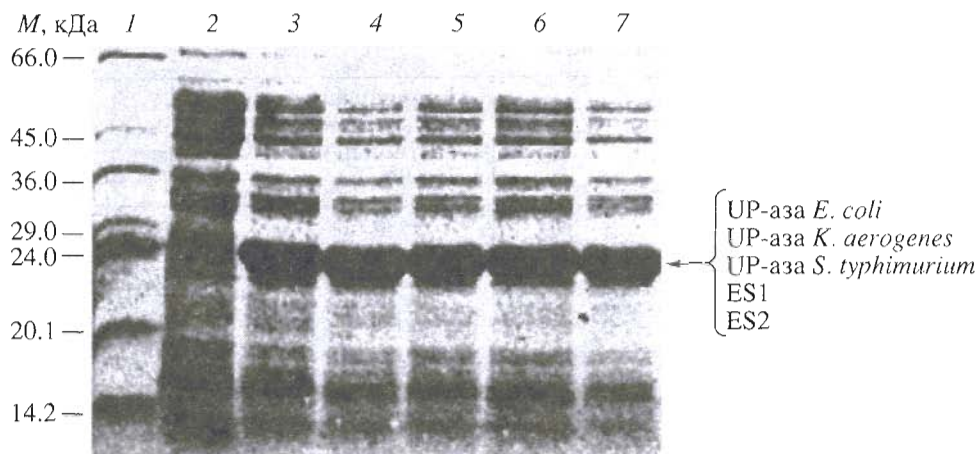


Рис. 2. Электрофоретическое разделение в SDS-ПААГ белков клеточных лизатов *E. coli* C600, трансформированных плазмидами: рUU18 (2), рUUDP (3), рSUDP (4), рKUDP (5), рES1 (6), рES2 (7). 1 – белки-маркеры.

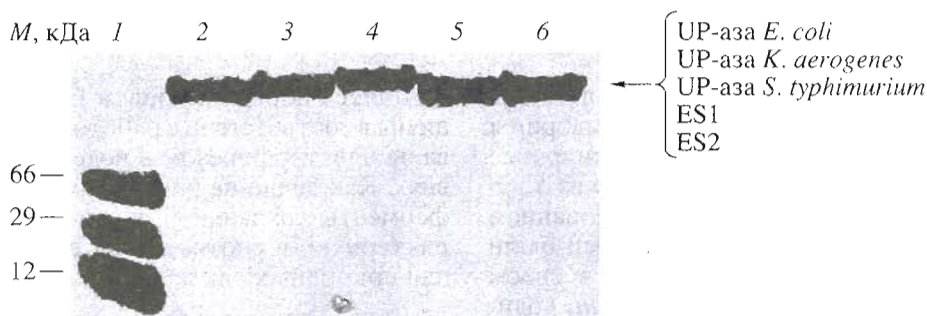


Рис. 3. Электрофоретический анализ в неденатурирующем ПААГ UP-аз *E. coli* (2) (гексамер – по данным работы [10]), *K. aerogenes* (3) (гексамер [1]), *S. typhimurium* (4) (гексамер [1]), ES1 (5), ES2 (6), белки-маркеры (1).

гибридного фермента ES1 не претерпело заметных изменений, как и значения рН-оптимума для обоих исследуемых белков. В то же время величина константы Михаэлиса по фосфату у фермента ES2 совпадала со значением K_m UP-азы из *S. typhimurium*, определенным ранее [1].

Таким образом, полученные результаты подтвердили влияние на функциональные свойства бактериальных UP-аз именно природных замен в N-концевой области белков. Это позволило продолжить исследование роли отдельных остатков путем внесения в аминокислотную последовательность UP-азы *E. coli* точечных мутаций.

Для выработки дальнейшей стратегии работ по локализации аминокислотных остатков в активном центре UP-азы *E. coli* K-12 нами был проведен сравнительный анализ известных на данный момент топологических схем элементов вторичных структур фосфорилаз нуклеозидов и некоторых других видов ферментов (гидролаз нуклеозидов, фосфорибозилтрансфераз), схожих по субстратной специфичности [10–16]. Полученные результаты показали необходимость более детального исследования возможной функцио-

нальной роли остатков, фланкирующих C-концевую область $\beta 1$ -тяжа β -листа.

Как видно на рис. 4 и 5, фрагмент аминокислотной последовательности 25–30 (номера аминокислотных остатков указаны по UP-азе *E. coli*), формирующий петлю между тяжем $\beta 1$ и α -спиралью H1, состоит у бактериальных UP-аз из пяти консервативных аминокислотных остатков и одного переменного – Asp29. Замена этого остатка на остаток Glu уже отмечалась выше как одна из возможных причин различий в свойствах UP-аз *E. coli* K-12, *K. aerogenes* и *S. typhimurium*. Проведенное с помощью олигонуклеотида (3) (таблица) конструирование и изучение свойств белка с мутацией D29T, заменяющей карбоксильную группу бокового радикала на полярный гидроксил, показало некоторое ухудшение сродства мутантной UP-азы к неорганическому фосфату и уридину с одновременным незначительным увеличением ферментативной активности (таблица). Сравнение кинетических характеристик мутантной UP-азы *E. coli* (D29T) и нативного белка позволяет утверждать, что остаток Asp29 не участвует в каталитическом превращении субстратов. Тем не менее данный остаток может быть значимым для

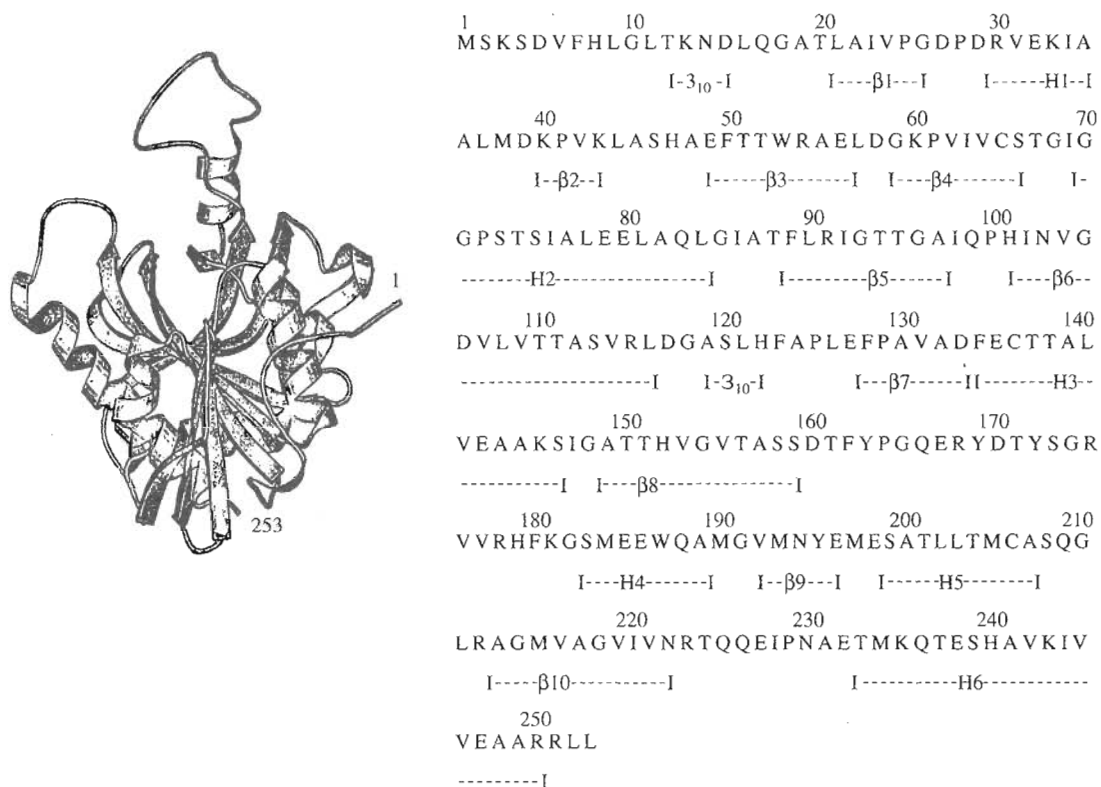


Рис. 4. Строение мономера UP-азы *E. coli* в моноклинных кристаллах (без субстратов), представленное в элементах вторичной структуры [11].

	1	10	20	30	40	50	60
<i>E. c.</i>	MSKSDVFHGLGLTKNDLQ	GATLAIVPGDPDRVEKIA	ALMDKPVKLA	SHREFTTWRAELDGK			
<i>S. t.</i>	MSKSDVFHGLGLTKNDLQ	GAQLAIVPGDPERVEKIA	ALMDKPVKLA	SHREFTSWRAELDGK			
<i>K. a.</i>	MSKSDVFHGLGLTKNDLQ	GATLAIVPGDPERVEKIA	ALMDKPVKLA	SHREFTSWRAELDGK			
<i>K. sp.</i>	MSKSDVFHGLGLTKNDLQ	GATLAIVPGDPERVEKIA	ALMDKPVKLA	SHREFTSWRAELDGK			
<i>H. i.</i>	MIIRRFIMS-G-VFHLNLT	KAQLKGATLAIVPGDP	ARSERIAKQL	DNPEFLTSTREFTSW	LG	INGQ	
		70	80	90	100	110	
<i>E. c.</i>	PVIVCSTGIGG	PSTSI AVEELA-QLGI--RTFL--RIGTTGAIQPHINVG	DVLVTTASVRL				
<i>S. t.</i>	AVIVCSTGIGG	PSTSI AVEELA-QLGI--RTFL--RIGTTGAIQPHINVG	DVLVTTASVRL				
<i>K. a.</i>	PVIVCSTGIGG	PSTSI AVEELA-HVGV--RTFL--RIGTTGAIQPHINVG	DVLVTTASVRL				
<i>K. sp.</i>	SLIVCSTGIGG	PSTSI RVEELASTLGVDSRT-LTPRIGTTGAIQPHINVG	DVLVTTASVRL				
<i>H. i.</i>	PIVVCSTGIGG	PSTSI CVEELA-QLGV--RTFL--RIGTTGAIQPHINVG	DVLITTA	AVRL			

Рис. 5. Сравнение аминокислотных последовательностей N-концевых фрагментов полипептидных цепей UP-аз из различных источников: *E. c.* – *E. coli* K-12 [17], *S. t.* – *S. typhimurium* LT 2 [1], *K. a.* – *K. aerogenes* 4140 [1], *K. sp.* – *Klebsiella* sp. LF 1202 [18], *H. i.* – *Haemophilus influenzae* [19]. Порядковые номера аминокислотных остатков даны по последовательности UP-азы *E. coli* [17]. Жирным шрифтом обозначены несовпадающие аминокислотные остатки, прочерками – отсутствующие.

поддержания оптимальной для связывания субстратов конформации активного центра фермента.

Действительно, синонимическая замена D29E (гибридный белок ES1) увеличивает длину боковой цепи на метиленовый остаток, что влияет на ее пространственную ориентацию и значение pK_a . Это может приводить к ухудшению взаимодейст-

вия данного аминокислотного остатка с другими участками молекулы UP-азы *E. coli* K-12 и появлению определенной дополнительной внешней подвижности фрагмента 26–30 полипептидной цепи, вследствие чего и происходит увеличение ферментативной активности. В то же время несинонимическая замена остатка Asp29 на остаток

Thr приводит к более заметным отличиям в величинах констант Михаэлиса для обоих субстратов. Кроме того, фермент с мутацией D29T показал активность на 10% выше по отношению к нативной UP-азе *E. coli* K-12, причем значение рН-оптимума смещалось на 0.5 ед. в кислую область (таблица). Это дало повод рассматривать возможность непосредственного вхождения соседних с Asp29 аминокислотных остатков в каталитический центр фермента.

В дальнейшем, среди ближайшего окружения остатка Asp29 наше внимание привлекли остатки Gly26 и Asp27, консервативные среди всех представленных на рис. 5 аминокислотных последовательностей. Фланкированность этого сегмента полипептидной цепи фермента остатками Pro25 и Pro28 создает жесткие конформационные ограничения для пространственной ориентации боковой цепи остатка Asp27. Проведенная в дальнейшем с помощью олигонуклеотида (4) замена D27G, уничтожившая боковой радикал и увеличившая подвижность этого участка полипептидной цепи, привела к падению активности фермента и возрастанию значения K_m по фосфату почти на порядок (таблица). Это позволяет отнести остаток Asp27 к структуре активного центра фермента. Произошедшее в случае его замены на остаток Gly ухудшение сродства к другому субстрату – уридину, скорее всего свидетельствует о сближенности в молекуле UP-азы участков связывания фосфата и рибозы.

Ранее [6] путем сайт-направленного мутагенеза была показана функциональная важность единственного из семи остатков His UP-азы *E. coli* – остатка His8. Проведенная замена D27G вызывала изменения сродства к субстратам, сопоставимые с результатами внесения мутации E89A [20] в аминокислотную последовательность PNP-азы человека. Это позволило предположить наличие у UP-азы необходимой для протекания реакции фосфорилиза уридина пары His8 и Asp27, аналогичной паре His86 и Glu89, участвующей в связывании фосфат-иона PNP-азой человека [21].

В то же время рентгеноструктурным анализом (РСА) UP-азы *E. coli* K-12 (без субстратов) [10, 11] установлено, что сегмент полипептидной цепи, образованный остатками Asp5–His8, формирует подвижную петлю и участвует в межсубъединичных контактах. В предыдущем сообщении [1] мы приводили результаты замены остатка Asp5 на остатки Glu, Ala, Asn. По данным, полученным с использованием грубого экстракта клеток генно-инженерных штаммов-продуцентов UP-аз, мутантные белки сохраняли ферментативную активность на уровне нативной UP-азы *E. coli* K-12. В то же время упомянутая нами выше замена E89A в аминокислотной последовательности PNP-азы человека также не приводила к серьезным изменениям

k_{cat} [20]. Это послужило причиной более детального исследования последствий для кинетических характеристик фермента изменений в кислотной функции бокового радикала остатка Asp5.

Один из трех представленных в предыдущей работе [1] мутантных белков, а именно UP-аза *E. coli* D5A, был выделен. Как видно из таблицы, замена D5A приводит к некоторому улучшению связывания субстратов при незначительном падении ферментативной активности. Таким образом, сделанный нами ранее вывод о невхождении остатка Asp5 в активный центр UP-азы *E. coli* K-12 нашел дополнительное подтверждение. В то же время произошедшее у мутантного белка D5A некоторое смещение рН-оптимума ферментативной активности в кислую область (таблица), могло свидетельствовать о сближенности остатка Asp5 с функционально важным остатком фермента, участвующем в переносе протона.

Возвращаясь к примеру PNP-азы человека, следует отметить, что происходящий с ее помощью фосфорилиз пуриновых нуклеозидов протекает по типу общего кислотно-основного катализа [21]. Выше уже было упомянуто, что для данного белка установлено участие пары His86 и Glu89 в депротонировании нуклеофила (дегидрированного неорганического фосфата). Таким образом, функционально важный остаток His86 выступает в роли общего основания. Это подтверждалось результатами рН-титрования фермент-субстратного комплекса PNP-азы человека: значения pK_{es1} и pK_{es2} равны 5.3 и 7.7, соответственно [22]. По мнению авторов работы [22], величина pK_{es1} отражает процесс диссоциации второго протона неорганического фосфата в активном центре этого фермента. Результаты проведенных аналогичных исследований для UP-азы из печени крысы, относящейся к щелочным фосфорилазам (рН-оптимум 8.0), позволил авторам статьи [23] сделать вывод о наличии в активном центре фермента остатка His (pK_{es1} 7.0).

По данным химической модификации UP-азы *E. coli* диэтилпирикарбонатом [24], этот реагент взаимодействует с тремя остатками His, но инактивация фермента достигается преимущественно за счет модификации одного, наиболее реакционноспособного из них, с pK_2 6.6. Скорость инактивации максимальна при рН 7.2, что совпадает со значением рН-оптимума активности UP-азы *E. coli*. Необходимо отметить, что диэтилпирикарбонат способен реагировать только с депротонированной формой имидазольного кольца остатка His. Следовательно, при оптимальном для протекания ферментативного фосфорилиза уридина значении рН (7.2) большинство остатков His8 гексамера UP-азы способно участвовать в передаче протона от нуклеофила (неорганического фосфата). При этом остаток Asp27 UP-азы

E. coli, аналогично остатку Glu89 PNP-азы из эритроцитов человека, должен усиливать основные свойства имидазольного кольца остатка His8. С этой точки зрения, сохранение значения рН-оптимума без изменений в случае замены D27G (таблица) явилось несколько неожиданным. Возможно, это связано с вкладом в остаточную активность мутантного фермента дианиона неорганического фосфата (значение pK_{a2} для ортофосфата равно 7.2).

Таким образом, результаты сравнения ферментативных свойств мутантных (H8N [6], D27G) белков и данных химической модификации позволяют предполагать существование у UP-азы *E. coli* системы переноса протона с участием остатков His8 и Asp27. Проведение PCA фермент-субстратного комплекса и применение современных методов спектрального анализа, например спектроскопии ядерного магнитного резонанса, помогло бы уточнить эти представления.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали агарозу (Type I), акриламид, дитиотреит, *N,N*-метиленисакриламид, Триоснование, SDS, борную кислоту, глицин, EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота), АТФ (аденозинтрифосфат), уридин, 2'-дезоксинуридин, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (Sigma, США); бромистый этидий, персульфат аммония, куасси R-250 (Serva, Германия); TEMED (*N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин) (Fluka, Швейцария); β -меркаптоэтанол (Bio-Rad Lab., США); Моно-Q сефарозу и набор белковых маркеров (Pharmacia, Швеция). Все остальные реактивы – отечественного производства квалификации “х. ч.” и “ос. ч.”.

Ферменты: эндонуклеазы рестрикции *SacI*, *BamHI*, *SalGI* – (Biolabs, США); Т4-ДНК-лигаза, Т4-полинуклеотидкиназа и модифицированная Т7-полимераза (Amersham, Англия); *Taq*-полимераза (Fermentas, Литва); РНКаза А (Sigma, США).

Бактериальный штамм *E. coli* K-12 C600 (*thi*, *thr*, *leu*, Δ *pro-lac*, Δ *met-udp*, *recA*) получен из музея ГосНИИгенетики.

Бактериальные клетки культивировали при 37°C на среде Лурия (L-бульон) [25]. Твердые среды содержали 1.5% агара. Компоненты бактериальных сред – триптон, дрожжевой экстракт и агар (Difco, США). Для обеспечения селективного роста клеток применяли ампициллин (100 мкг/мл).

Выделение плазмидной ДНК проводили по методу Бирнбойма и Доли [26]. Приготовление компетентной культуры клеток *E. coli* и их трансформацию проводили как описано в [25].

Дезоксирибоолигонуклеотиды синтезировали и выделяли согласно методикам [27, 28].

Сайт-направленная реконструкция ДНК при конструировании мутантных аллелей гена *udp*

E. coli K-12 проводилась по двухстадийной схеме, аналогичной описанной в основном тексте статьи для генов гибридных UP-аз (*es1* и *es2*), с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Нуклеотидную последовательность ДНК определяли по методу Сэнгера [29].

Белковый электрофорез проводили по методу Леммли [30]. Концентрацию белков в растворах определяли по методу Брэдфорд [31].

Очистку нативных бактериальных, гибридных и мутантных UP-аз проводили согласно схеме, изложенной в работе [9].

Ферментативную активность нативных бактериальных UP-аз и их мутантных и гибридных форм определяли спектрофотометрически, непрерывно измеряя разницу в поглощении при 280 нм соответствующего нуклеозида и образующегося в результате ферментативной реакции гетероциклического основания (25°C). Для расчетов использовали $\Delta E_{280} = 2.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для пары уридин/урацил [32]. Реакционная смесь содержала в общем объеме 2 мл: 50 мМ однозамещенный фосфат калия, рН 7.2, 0.5 мМ нуклеозид, 10 мкл (0.5–5 ед./акт.) клеточного экстракта или раствора очищенного фермента.

Константу Михаэлиса по уридину определяли, изменяя его концентрацию в реакционной смеси от 0.01 до 1 мМ, при постоянной концентрации фосфата (50 мМ при рН 7.2); K_m по фосфату определяли, изменяя концентрацию фосфата в реакционной смеси от 3 до 150 мМ (рН 7.2), при постоянной концентрации уридина (0.5 мМ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вейко В.П., Чеботаяев Д.В., Овчарова И.В., Гулько Л.Б. // Биоорг. химия. 1998. Т. 24. С. 381–387.
2. Hammer-Jespersen K. // Metabolism of Nucleotides, Nucleosides and Nucleobases in Microorganisms / Ed. Munch-Petersen A. London, New York, San Francisco: Acad. Press, 1983. P. 203–258.
3. Luccioni C., Beaumatin J., Bardot V., Lefrancois D. // Int. J. Cancer. 1994. V. 58. P. 517–522.
4. Ashour O.M., Naguib 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.
5. Watanabe S.-I., Uchida T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. V. 216. P. 265–272.
6. Вейко В.П., Сипрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б. // Биоорг. химия. 1995. Т. 21. С. 834–837.
7. Вейко В.П., Сипрашвили 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.
8. Вейко В.П., Осипов А.С., Шехтер И.И., Буленков М.Т., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Чибискова Н.А., Эррайс Л.Л., Деревщицкова Е.Б., Дебабов В.Г. // Биоорг. химия. 1995. Т. 21. С. 354–358.

9. Ling F., Inoue Y., Kimura A. // *Process Biochemistry*. 1994. V. 29. P. 355–361.
10. Моргунова Е.Ю., Михайлов А.М., Комиссаров А.А., Мао Ч., Линькова Е.В. и др. // *Кристаллография*. 1995. Т. 40. С. 672–680.
11. Morgunova E.Y., Mikhailov A.M., Popov A.N., Blagova E.V., Smirnova E.A., Vainshtein B.K., Mao Ch., Armstrong Sh.R., Ealick S.E., Komissarov A.A., Linkova E.V., Burlakova A.A., Mironov A.S., Debabov V.G. // *FEBS Lett.* 1995. V. 367. P. 183–187.
12. Degano M., Gopaul D.N., Scapin J., Schramm V.L., Sacchettini J. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 5971–5981.
13. Scapin J., Grubmeyer C., Sacchettini J. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 1287–1294.
14. Eads J.C., Scapin J., Xu Y., Grubmeyer C., Sacchettini J. // *Cell*. 1994. V. 78. P. 325–334.
15. Koellner G., Luic M., Shugar D., Saenger W., Bzowska A. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 280. P. 153–166.
16. Ealick S.E., Rule S.A., Carter D.C., Greenhough T.J., Babu Y.S., Cook W.J., Habash J., Helliwell J.R., Stoekler J.D., Parks R.E., Chen S., Bugg C.E. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 1812–1820.
17. Walton L., Richards C.A., Elwell L.P. // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 16. P. 6741–6744.
18. Takehara M., Ling F., Izawa S., Inoue Y., Kimura A. // *Bio-science. Biotechnol. Biochem.* 1995. V. 59. P. 1987–1990.
19. 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. et al. // *Science*. 1995. V. 269. P. 449–604.
20. Erion M.D., Takabayashi K., Smith H.B., Kessi J., Wagner S., Honger S., Shames S.L., Ealick E. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 11725–11743.
21. Erion M.D., Stoekler J.D., Guida W.C., Walter R.L., Ealick E. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 11735–11748.
22. Jordun F., Wu A. // *J. Med. Chem.* 1978. V. 21. P. 877–882.
23. Bose R., Yamada E.W. // *Biochemistry*. 1974. V. 13. P. 2051–2056.
24. Drabikowska A.K., Wozniak G. // *J. Biochem.* 1990. V. 270. P. 319–323.
25. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Ed.* Cold Spring Harbor. New York; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
26. Birnboim H.C., Doly J. // *Nucl. Acids Res.* 1979. V. 7. P. 1513–1532.
27. Jones R.A. // *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* / Ed. M.J. Gait. Oxford; Washington DC: IRL Press, 1984. P. 23–24.
28. Вейко В.П., Ратманова К.И., Осипов А.С., Буленков М.Т., Пугачев В.В. // *Биоорган. химия*. 1991. Т. 17. С. 685–689.
29. Sanger F., Coulson A.R. // *J. Mol. Biol.* 1975. V. 94. P. 441–446.
30. Laemmli U. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
31. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 2. P. 248–254.
32. Vita A., Huang C.Y., Magni G. // *Arc. Biochem. Biophys.* 1983. V. 226. P. 687–692.

Protein Engineering of Uridine Phosphorylase from *Escherichia coli* K-12, II. A Comparative Study of the Properties of Hybrid and Mutant Forms of Uridine Phosphorylases

D. V. Chebotaev, L. B. Gul'ko, and V. P. Veiko[#]

e-mail: veiko@genetika.ru.

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

Genes for hybrid uridine phosphorylases (UPases) consisting of fragments of amino acid sequences of UPases from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* were constructed. Producing strains of the corresponding proteins were genetically engineered. Mutant forms of the *E. coli* K-12 UPase were produced by site-directed mutagenesis. A comparative study of the enzyme properties of the mutant and hybrid forms of bacterial UPases was performed. It was shown that Asp27 unlike Asp5 and Asp29 residues of the *E. coli* UPase forms part of the active site of the protein. A scheme of the involvement of Asp27 in the binding of inorganic phosphate is proposed. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: uridine phosphorylase, site-directed mutagenesis, PCR, udp gene