



ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОЗИДМОНОФOSFATКИНАЗЫ БАКТЕРИОФАГА T5 МЕТОДОМ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА

© 2013 г. Г. В. Микулинская*, #, С. А. Таран*, Ю. С. Скоблов**, С. А. Феофанов*

*Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
142290, Пущино, проспект Науки, 6

**ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 23.04.2013 г. Принята к печати 23.05.2013 г.

На основании компьютерной модели активного центра дезоксирибонуклеозидмонофосфаткиназы бактериофага T5 (dNMPKT5) определены аминокислотные остатки, важные для ферментативной активности. В результате сайт-направленного мутагенеза, клонирования и экспрессии гена dNMPKT5 в клетках *E. coli* получен ряд белков, содержащих единичные замены консервативных аминокислотных остатков активного центра – S13A, D16N, T17N, T17S, R130K, K131E, Q134A, G137A, T138A, W150F, W150A, D170N, R172I, E176Q. После ионообменной и аффинной хроматографической очистки полученные препараты мутантных форм белка были электрофоретически гомогенными. Исследование ферментативной активности этих белков на природных акцепторах фосфорильной группы (dAMP, dCMP, dGMP, dTMP) показало, что замены заряженных аминокислот NMP-связывающего домена – R130, R172, D170 и E176 – приводят к практически полной потере ферментативных свойств. Установлено, что для каталитической активности фермента важно наличие HO-группы аминокислотного остатка в положении 17. На основании изменений удельной активности мутантных форм фермента предполагается, что остатки аргининов 130 и 172 участвуют в связывании γ -фосфорильной группы донора и α -фосфорильной группы акцептора, а остаток аспарагиновой кислоты в положении 16 АТР-связывающего сайта также участвует в связывании ряда акцепторов фосфорила, прежде всего dTMP. Непропорциональное изменение ферментативной активности на разных субстратах у частично активных мутантов – G137A, T138A, T17N, Q134A, S13A, D16N – позволяет предполагать, что в связывании разных акцепторов фосфорила участвуют разные аминокислотные остатки.

Ключевые слова: нуклеозидмонофосфаткиназа, бактериофаг T5, сайт-направленный мутагенез.

DOI: 10.7868/S0132342313060079

ВВЕДЕНИЕ

Исследование структуры активных центров ферментов важно для понимания процессов ферментативного катализа. Изучение структуры нуклеозидмонофосфаткиназы (NMPK), относящихся к семейству фосфотрансфераз с фосфорильной группой в качестве акцептора (КФ 2.7.4), имеет как фундаментальный, так и прикладной интерес, связанный с широким применением модифицированных нуклеозидов в медицине. Именно NMPK обеспечивают ключевую стадию фосфорилирования в клетке ациклических нуклеозидфосфонатов – нового класса противовирусных

агентов [1]. Сведения о структуре NMPK помогают создавать химерные ферменты, обладающие нужной специфичностью, что позволяет рассчитывать на их успешное применение в терапии онкологических заболеваний и при лечении иммунодефицита человека [2, 3]. Имеются примеры применения чужеродных киназ, доставляемых в клетки при помощи вектора одновременно с производными нуклеозидов, в вирусной и раковой терапии [4]. Изучение структуры NMPK помогает понять функционирование более сложных белков, содержащих нуклеотидсвязывающие домены, например белков класса MAGUK [5].

К настоящему времени известны решенные методами рентгеноструктурного анализа кристаллические структуры целого ряда NMPK из различных источников: аденилаткиназа [6, 7], уридилаткиназа [8, 9], тимидилаткиназа [3, 10], цити-

Сокращения: NMPK и dNMPK – нуклеозид/рибонуклеозидмонофосфаткиназы и дезоксирибонуклеозидмонофосфаткиназы.

Автор для связи (тел.: +7 (4967) 73-17-80; эл. почта.: miku-linskaya@bibch.ru).

дилаткиназы *E. coli* [11], гуанилаткиназы мыши [12] и ряда NMPK из других организмов.

Альтернативным подходом к изучению активного центра является сайт-направленный мутагенез. Замена одного или нескольких аминокислотных остатков, сопровождаемая изучением ее влияния на кинетические характеристики фермента, — такие, как скорость катализа и/или субстратная специфичность, — позволяет не только судить о роли отдельных аминокислот в катализе, но и изменять каталитические свойства белка. Так, точечная замена консервативного остатка глутамина в аденилаткиназе приводит к способности фермента фосфорилировать UMP [13].

dNMP-киназа бактериофага T5 (dNMPKT5), в отличие от большинства известных NMPK, обладает широкой субстратной специфичностью и способна фосфорилировать все четыре канонических природных dNMP — dCMP, dGMP, dAMP и dTMP. Ранее нами был секвенирован участок генома фага T5, содержащий ген *dnk*, кодирующий dNMPK; ген был идентифицирован, клонирован под контролем эффективного промотора и экспрессирован [14]. Было показано, что, кроме природных нуклеотидов, dNMPKT5 фосфорилирует α -S-AMP [15], а также рибонуклеозидмонофосфаты [16].

Целью настоящей работы было установление аминокислотных остатков, входящих в структуру активного центра dNMPKT5 и вовлеченных в катализ. В связи с этим планировалось: с помощью сайт-направленного мутагенеза и технологии белковой инженерии сконструировать ряд плазмид, несущих гены dNMPKT5, содержащие единичные замены консервативных аминокислот активного центра; добиться стабильной продукции мутантных форм dNMPKT5 в клетках *E. coli*; получить чистые препараты мутантных белков; проанализировать влияние аминокислотных замен на удельные активности фермента для природных акцепторов фосфорильной группы (dAMP, dGMP, dTMP, dCMP) и сделать выводы о роли отдельных аминокислот в функционировании фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование структуры dNMPKT5

Большинство известных NMPK — небольшие мономерные (реже — гомодимерные) белки, относящиеся к α/β -классу, обычно состоят из 5 β -складок, окруженных 8–9 α -спиралями. NMPK имеют доменную структуру и состоят из трех доменов: основного, или CORE, содержащего АТФ-связывающую Р-петлю (P-loop, фосфатсвязывающая петля, мотив Уолкера А (WalkerA)), а также NMP-связывающего домена (NMPbind) и домена LID, соединенных с CORE перемычками [17] (см. рис. 1).

При этом структуры NMPK довольно различны: так, NMP-связывающий сайт аденилаткиназ

преимущественно α -спиральный, а у гуанилаткиназ в основном состоит из β -складок [12]. Шарнирное сочленение доменов и их подвижность друг относительно друга обеспечивают конформационные изменения, происходящие при связывании субстрата [18, 19]. Принято считать, что движение NMPbind и LID относительно CORE, индуцированное связыванием субстратов, обеспечивает “закрытие” активного сайта, в результате чего происходит катализ [12, 20, 21]. В последнее время появилось представление о том, что в процессе непрерывного катализа конформация фермента не полностью “открытая”, а флуктуирует между так называемой “полуоткрытой-полузакрытой” конформацией (стабилизированной водным окружением) и “закрытой”, содержащей оба лиганда (донор и акцептор фосфорила) [22]. При этом скорость реакции лимитируют не конформационные изменения в белке, а собственно процесс переноса фосфорила. Общепринятым является представление о том, что фосфорилирование протекает по неупорядоченному Vi-Vi-механизму [17, 23], однако это предполагает независимое движение доменов NMPbind и LID, чему противоречит ряд экспериментальных данных. Так, показано, что связывание NMP провоцирует “закрытие” LID [24]. Также до сих пор ведутся дискуссии по поводу способа стабилизации переходного состояния (transition state); большинство исследователей в настоящее время считают наиболее вероятным ассоциативный sn_2 -механизм [8, 24, 25]. Отсутствие полной ясности можно объяснить тем, что ни один из белков не удалось получить в кристаллическом состоянии во всех четырех формах — апофермент, комплекс с одним субстратом (донор фосфорила), с другим субстратом (акцептор фосфорила) и четвертичный комплекс с обоими субстратами. Кроме того, ввиду сложностей, испытываемых при кристаллизации ферментов в присутствии природных субстратов, часто в этих целях применяют их искусственные имитаторы (например, AP_5A , UP_5A , TP_5A , AMP_5CF_2P — 5'-аденилил(β, γ -дифторметил)дифосфонат и др.), что затрудняет трактовку результатов. Например, при кристаллизации GMPK *E. coli* с AP_5G фермент находился в не полностью “закрытой” конформации, с остатком аденина вне сайта связывания донора фосфорила [26].

Большинство известных нуклеозидмонофосфаткиназ, как бактериальных, так и эукариотических, узкоспецифичны к азотистому основанию акцептора фосфорила. Неудивительно, что за связывание субстрата у аденилаткиназ, тимидилаткиназ, гуанилаткиназ отвечают разные аминокислоты [17]. Исключение составляют несколько NMPK, кодируемых вирулентными бактериофагами. Эти киназы, призванные обеспечить высокую скорость синтеза ДНК в процессе фаговой инфекции, способны эффективно фосфорилировать целый ряд субстратов [27, 28].

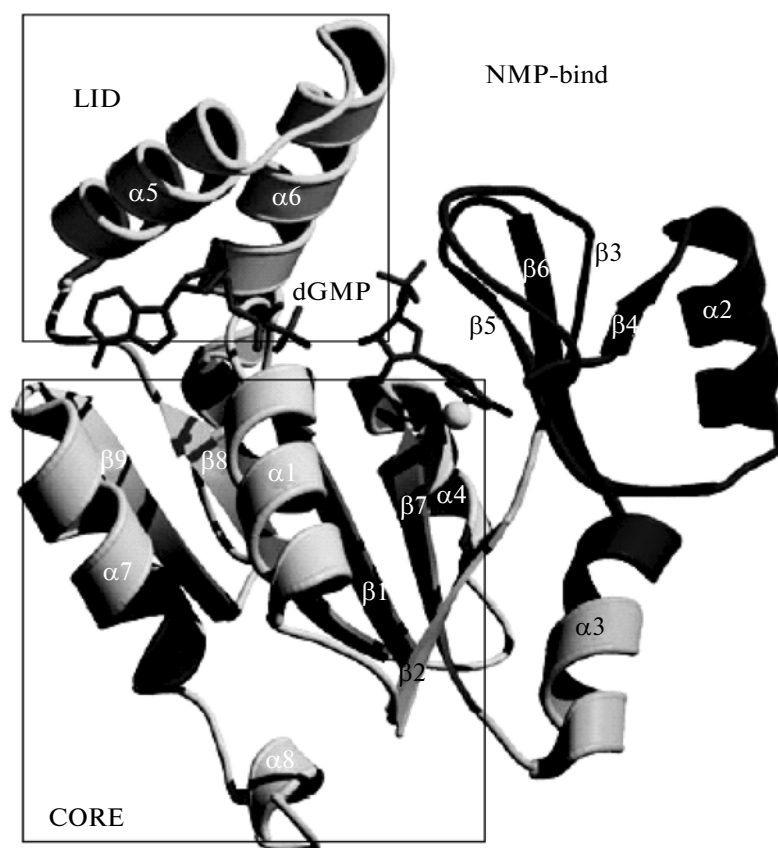


Рис. 1. Схематическое изображение доменной структуры гуанилаткиназы мыши (по [12]). α – альфа-спиральные участки полипептидной цепи, β – β -складчатые участки.

Несмотря на то, что большое количество NMPK получено в кристаллическом состоянии, и число известных структур все возрастает, до сих пор имеется лишь одна широкоспецифичная фаговая NMPK, чья структура была получена с разрешением 2.2 Å – dNMP-киназа бактериофага T4 (КФ 2.7.4.12, dNMPKT4) [29].

dNMPKT4 имеет димерную структуру и способна фосфорилировать три структурно неродственных субстрата – dGMP, dTMP и 5'-hm-dCMP (5'-гидроксиметилдезоксцитидинмонофосфат, в геноме T-четных колифагов заменяет свой природный аналог, dCMP). Структура dNMPKT4 (241 а.о.) имеет ряд особенностей. NMPbind этого фермента необычно велик, а LID, напротив, слабо выражен. CORE содержит АТФ-связывающий участок, включающий глицинбогатую Р-петлю, и состоит из аминокислотных остатков 1–32 и 165–241, NMP-связывающий “карман” представлен пятью альфа-спиралями (аминокислоты 33–149). Домен LID, “прикрывающий” активный центр при связывании субстратов, укорочен до 15 а.о. (участок 197–211) и содержит только один из характерных для этого домена аргининов, взаимодействие кото-

рых с фосфатными группами АТФ у киназ обеспечивает “закрытие” домена [24].

Полипептидная цепь dNMPK бактериофага T5 (КФ 2.7.4.13) состоит из 250 а.о. [14]. Сравнительный анализ белковых баз данных программой PSI-BLAST выявляет целый ряд подобных аминокислотных последовательностей, принадлежащих различным фаговым киназам; в их числе и dNMPKT4. Значение сходства аминокислотных последовательностей нельзя преувеличивать, особенно учитывая различия в субстратной специфичности: dNMPKT5, в отличие от dNMPKT4 (см. выше), фосфорилирует четыре “канонических” дезоксирибонуклеотида (dCMP, dGMP, dAMP и dTMP). Кроме того, dNMPKT5, в отличие от dNMPKT4, не является димером [14].

Проведенный нами биоинформационный анализ аминокислотных последовательностей, тем не менее, выявил, что сходство NMPK бактериофагов между собой намного более выражено, чем с узкоспецифичными NMPK других организмов – обоими подсемействами аденилаткиназ, CMP-UMP-киназами, гуанилаткиназами, тимидилаткиназами. В частности, консенсусная последовательность

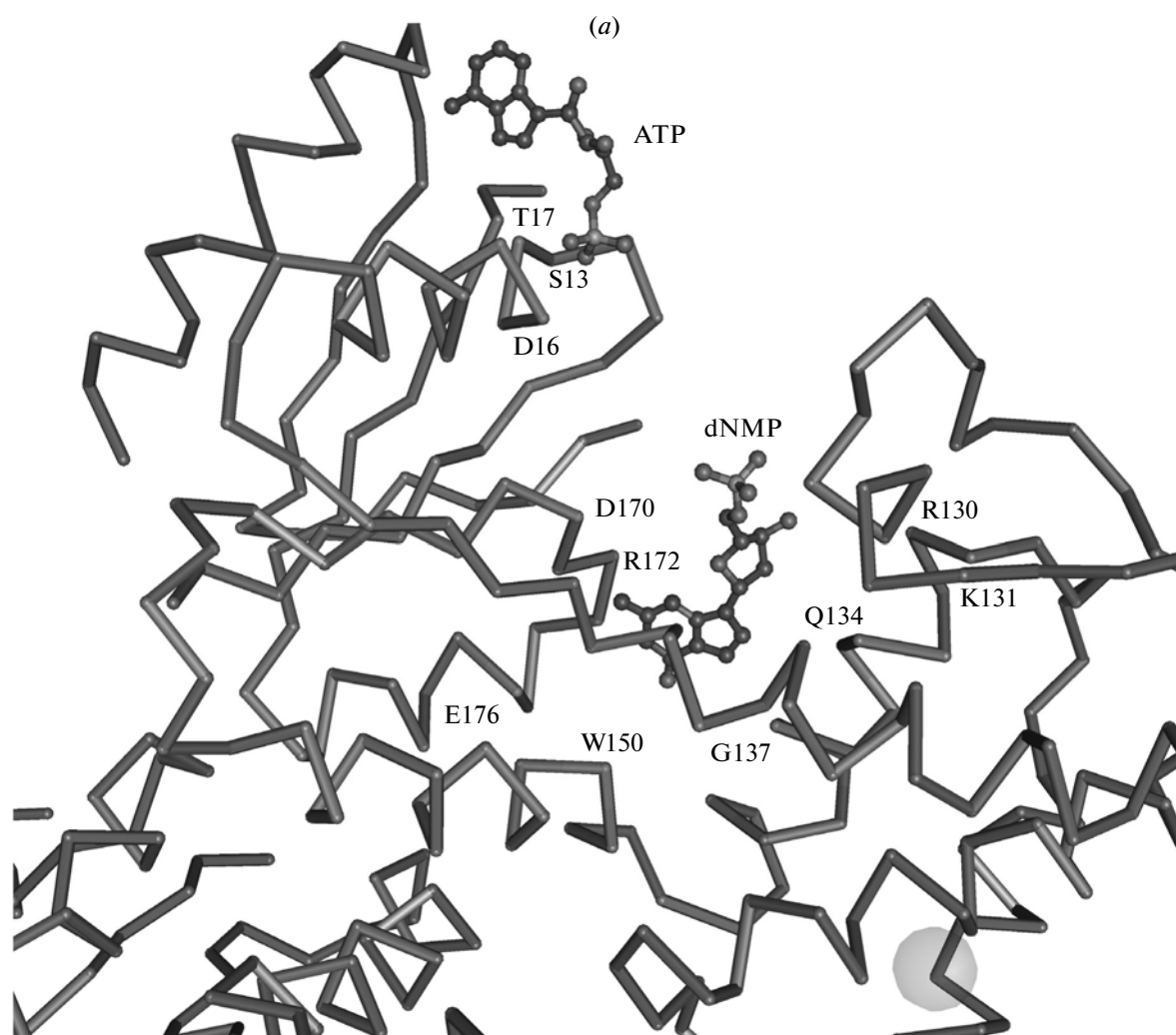


Рис. 2. Компьютерное моделирование структуры фаговых NMPK. *a* – Результат пространственного наложения первичных структур киназ бактериофагов T5, RB69, KVP40, Felix 01 на известную пространственную структуру dNMPK бактериофага T4. Красным цветом выделены консервативные аминокислоты, выбранные для точечного мутагенеза (кроме T138, скрытого за предшествующим глицином 137); синим цветом окрашены участки одинаковой вторичной структуры; *b* – множественное выравнивание аминокислотных последовательностей NMPK бактериофагов T4, T5, RB69, KVP40 и Felix 01. Цифры в начале и конце строк – порядковые номера аминокислот соответствующих участков. Подчеркнуты аминокислоты dNMPKT5, выбранные для мутагенеза. Жирным шрифтом выделены консервативные аминокислоты; заглавными буквами обозначены аминокислоты участков одинаковой вторичной структуры.

P-петли, в общем виде выглядящая у АТФ-связывающих белков как GXXXXGK [17], у фаговых киназ имеет вид GXXXSGKDT (см. рис. 2*б*). Таким образом, помимо “инвариантного” лизина К, чья роль заключается как в поддержании структуры белка [30], так и в связывании β- и γ-фосфорильных групп АТФ и стабилизации переходного состояния [31] и чья замена (например, на аргинин в белках класса MAGUK) приводит к неспособности связывать АТФ [5], P-петля содержит консервативные серин, треонин и аспарагиновую кислоту.

Программа Cn3D Viewer 3.0 позволяет моделировать вторичную структуру белка на основании пространственного наложения его полипептид-

ной цепи на уже известную структуру другого белка при условии достаточного сходства между последовательностями. С помощью этой программы мы проанализировали потенциальную структуру NMPK ряда фагов, и прежде всего хорошо нами изученной dNMPKT5 [14], с помощью моделирования ее на основании известной структуры dNMPKT4, с целью выявления консервативных аминокислотных остатков. На рис. 2*а* и 2*б*, приведен результат такого моделирования, выполненного посредством указанной программы.

В результате такого анализа были выявлены три консенсусных участка: уже упоминавшаяся P-петля (аминокислоты 9–17) и два альфа-спиральных участка, окружающих центральную

(б)

T4	1	~mKLIIFLSG VKRSGKDT TADFIMSNYS AVKYQLAGPIKDA layawgvfaantdypcltrk	59
RB69	1	~mELIIFLS GIKRSGKDT TADYINSNFKSIKYQLAYPIKDAlaiawerkhaenpdvftelk	59
KVP40	1	~MIIGING QKRSGKDT VAQAIQDIHSDNAYIYKFADPIKeglyiglkeygyeyadidgq	58
Felix_01	1	msNIIAFT GKARSGKDT SCSIVKNILEDEYGYNVEVMAFAdnlklsaskifdltwndlyg	60
T5	1	msVLVGLH GEAGSGKDT VAKLIIDWCNDTYPTCLSRYSFakpvyelasvilgvtpeflg	60
T4	60	efegidydretnlnltklevitimeq~~~~~afcylnqkspikgvfvfddegkesvnfva	114
RB69	60	yeyfegigydretpnlknkldvielmeetliylqrqylpingvnllssleggysyldikp	119
KVP40	59	nnfdrevptftlde~~~~~aielvltcceyanvdad	89
Felix_01	61	etketpqvfdlsypelmfkvteamef~~~~tfrderyhmdfklmseltgrlimelkkvak	116
T5	61	errgkeidqwfvtvtsqlerardv~~~~~wfkgyidkfedfsyvwpifeekeylnpqg	112
T4	115	fnkitdvinniedqws VRRMLQALGT DliVNNFDRMY WVKLF ~~~ALDYLDKFNSGYdy~	170
RB69	120	yealreainnindtws IRRRMLQALGT DvvVNLFDPRMY WVKLF ~~~ALNYMDYIGSDFdy~	175
KVP40	90	ydyvvytllphtklfs IRDLLQMTGT Dv~ARSLDDQHWINYA~~~RNKYNELVFKNPdl~	144
Felix_01	117	ptlltrlgfskkykfs SRQIQIWTGTE vRKVMGDKF W SKDLekrMVRFYEMCSLRNqyg	176
T5	113	lisenkedglyslfis PRKMLQLVGT ElgRQLVHERI WLIIL ~~~EQSIAKDDPDVA~~~	166
T4	171	~yIVP DTRQDHE MDAARAMGATVIHVVRPGQKSNDPHTEAGLPIRDGLVITNDGSLEE	229
RB69	176	~yVVT DTRQVHE METARAMGATVIHVVRSGTESTDKHITEAGLPIEEGLVITNDGSLEE	234
KVP40	145	vfiIT DVRFQNE LELVQELGGTMLQVNRGSLASNHVSDTELGFIKDAIQIDNNGSLEEL	204
Felix_01	177	fvLIS DLRFDS EAEWLSRFAHQTIIEVKRDNDVKVSSHVSENGISTKYERDI IHNNGTLAD	236
T5	167	~~VIT DVRF PN E GELLRETNHLDMDSLLVNVVPAEQKFTIKSDHPSESGIPAKYITHEL	224
T4	230	Lfskikntlkvl~~~~~	241
RB69	235	Lyskiekilr~~~~~	244
KVP40	205	Heqinklf~~~~~	212
Felix_01	237	Lenklratikv~~~~~	247
T5	225	Nkfdginnlklevynfcdleleplvg	250

Рис. 2. Окончание.

β-складку NMP-связывающего домена (аминокислоты 130–138 и 170–176) (нумерация по T5). Кроме того, обнаружен находящийся “на дне” NMP-связывающего “кармана” консервативный триптофан 150.

Мутагенез

Для выяснения роли отдельных аминокислотных остатков dNMPKT5 в катализе были выполнены единичные замены консервативных остатков и проведено дальнейшее сравнительное исследование активности и специфичности мутантных ферментов. Для направленного мутагенеза были выбраны следующие консервативные аминокислоты: относящиеся к Р-петле S13, D16, T17, аминокислоты NMPbind R130, K131, Q134, G137, T138, консервативный W150, а также входящие в состав CORE D170, R172, E176 – у dNMPKT4 они образуют α-спиральные “стенки” нуклеотидсвязывающего “кармана” (см. рис. 1). Методом сайт-направленного мутагенеза были получены 14 мутантных форм киназы бактериофага T5,

содержащих единичные аминокислотные замены, – S13A, D16N, T17N, T17S, R130K, K131E, Q134A, G137A, T138A, W150F, W150A, D170N, R172I, E176Q. Это преимущественно “аланиновые” замены, радикально не влияющие на структуру; однако среди замен есть мутации со сменой заряда (K131E) или его потерей (D16N, D170N, R172I, E176Q), а также несколько замен на аналогичные аминокислоты (серин–треонин, триптофан–фенилаланин, аргинин–лизин).

Выделение и очистка белков

Для всех мутантных плазмид получена эффективная экспрессия полноразмерного белкового продукта. Для очистки целевых белков использовали ионообменную хроматографию на DEAE-сорбентах и аффинную хроматографию на сорбентах со специфическими красителями. Способ очистки был разработан ранее для природной формы белка [14] и позволяет получать исследуемые ферменты в электрофоретически гомогенном состоянии с высоким выходом по ферментативной

активности (до 70%). Все полученные мутантные ферменты, включая малоактивные, имеют изоэлектрическую точку, близкую к таковой для природного фермента, что позволило успешно использовать для их выделения условия DEAE-хроматографии, подобранные для фермента дикого типа. Постадийный результат типового выделения представлен на рис. 3. Как показал контроль на примесные ферментативные активности, полученные таким образом препараты не содержали на АТР-азной, ни NADH-оксидазной активности.

Анализ активности и субстратной специфичности мутантов

Для всех выделенных ферментов были определены удельные активности для различных акцепторов фосфорильной группы – природных дезоксирибонуклеотидов (dAMP, dGMP, dCMP, dTMP) (табл. 1) и их соотношения (для каждого мутанта за 100% принимали максимальную в отношении исследуемых субстратов удельную активность, табл. 2).

Даже поверхностный анализ данных табл. 1, 2 показывает, что изменение активности в результате мутагенеза происходит непропорционально для различных акцепторов. Так, наиболее устойчивой к изменению является dCMP-киназная активность (у 9 из 13 мутантов она составляет четверть и более от активности природного фермента), в семи случаях достаточно высока dAMP-киназная активность, а наиболее значительно падает активность с dTMP и dGMP в качестве субстратов. Наибольшая чувствительность к мутациям проявляется в отношении активности фермента при использовании в качестве акцептора dTMP. Нужно отметить, что тимидилаткиназная активность играет ключевую роль в биосинтезе дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Связывая два пути биосинтеза dTTP (реутилизация тимидина и синтез *de novo*) – трифосфата, который, в свою очередь, является аллостерическим регулятором рибонуклеотидредуктазы, – тимидилаткиназа участвует в регуляции биосинтеза предшественников нуклеиновых кислот в целом [32, 33].

Стоит выделить результаты, на основании которых можно сделать несколько заключений о структуре активного центра исследуемого фермента и обобщить их для широкоспецифичных фаговых NMPK в целом.

Особенности строения АТР-связывающего сайта

P-петля, или глицинбогатая петля, у NMPK образует “анионный канал” (anion hole), взаимодействующий с фосфорильными группами донора [34, 35]. Она содержит консенсус, иначе именуемый мотивом Уолкера А: GX₁X₂X₃X₄GKX₅T(S); в положении X₅ у аденилаткиназ находится глицин, у гуанилаткиназ – серин. Глицины P-петли участвуют в

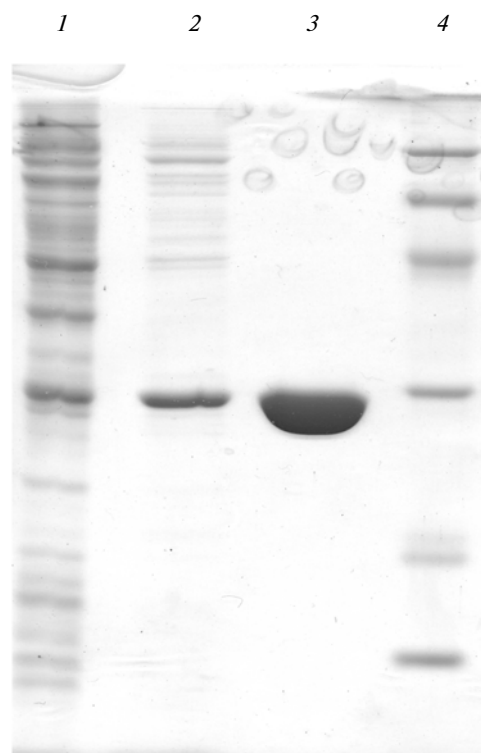


Рис. 3. Электрофорез фракций белка на разных стадиях очистки. 1 – грубый экстракт, 2 – фракция после хроматографии на DEAE-Toyopearl 650M, 3 – фракция после аффинной хроматографии, 4 – маркеры молекулярной массы (сверху вниз: 94, 66, 45, 29, 20.1, 14.2 кДа).

поддержании структуры петли [36]; так, их точечные мутации у UCMK *Arabidopsis* приводили к быстрой деградации белков в процессе очистки [37]. Консервативный “инвариантный” лизин и два следующих за ним аминокислотных остатка участвуют в связывании лиганда [36]. Лизин взаимодействует с β- и γ-фосфорильными группами АТР [37]; показано, что он стабилизирует структуру активного центра, образуя “мост” между фосфорильными группами АТР и NMP, а также участвует в образовании координационной сферы Mg²⁺ [25].

У рассматриваемых нами фаговых NMPK мотив Уолкера выглядит так: GX₁X₂X₃SGKDT.

Замены в АТР-связывающем сайте dNMPKT5 в положениях S13 и D16 приводят к появлению мутантов с достаточно высокой активностью на всех субстратах-акцепторах, за исключением одного: S13A малоактивен на dGMP, а D16N – на dTMP (активность D16N на dGMP также снижена, но в меньшей степени). Ранее уже было показано при мутагенезе других NMPK, что мутации некоторых аминокислот P-петли могут ухудшать связывание не только (d)АТР, но и монофосфатов-акцепторов фосфорила [13, 37]. Можно пред-

Таблица 1. Удельные активности (ед. акт./мг) мутантных киназ на различных акцепторах фосфорила*

Мутант	dAMP	dTMP	dGMP	dCMP
S13A	45.04 ± 5.52	32.22 ± 0.78	11.94 ± 1.22	22.74 ± 0.16
D16N	37.24 ± 0.43	6.59 ± 0.05	13.87 ± 0.49	23.60 ± 0.02
T17N	16.74 ± 1.65	1.76 ± 0.05	4.03 ± 0.28	5.03 ± 0.45
T17S	61.45 ± 1.48	28.21 ± 0.92	35.10 ± 4.64	18.28 ± 0.78
R130K	0.29 ± 0.02	0.04 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.15 ± 0.00
K131E	79.72 ± 2.78	35.31 ± 1.67	31.21 ± 2.67	25.44 ± 2.22
Q134A	17.53 ± 0.20	2.07 ± 0.04	2.8 ± 0.05	7.73 ± 0.16
G137A	0.49 ± 0.00	0.35 ± 0.02	1.37 × 10 ⁻³ ± 0.00	4.65 ± 0.01
T138A	37.27 ± 5.95	1.61 ± 0.04	3.92 ± 0.31	5.20 ± 0.25
W150F	76.23 ± 0.91	48.31 ± 1.32	43.91 ± 0.03	22.49 ± 0.27
D170N	1.02 ± 0.13	0.09 ± 0.02	0.055 ± 0.00	0.077 ± 0.001
R172I	0.014 ± 0.00	0.009 ± 0.00	0.014 ± 0.00	0.14 ± 0.02
E176Q	2.41 ± 0.12	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.02
Фермент дикого типа	73.17 ± 3.80	41.24 ± 1.77	36.54 ± 1.20	25.78 ± 2.53

* За 1 ед. акт. принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль монофосфата в минуту при температуре 25°C. Значения активностей представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение ($n = 3$).

положить, что пространственная близость сайтов связывания донора и акцептора при “закрытии” активного центра, предшествующем катализу, создает предпосылки для взаимодействия аминокислот Р-петли с обоими субстратами. Результаты мутагенеза консервативного остатка D16 коррелируют с данными литературы о мутагенезе аспарагиновой кислоты, находящейся в положении X₂ Р-петли тимидилаткиназ дрожжей и человека; ее замены приводили к потере активности фермента [3]. Таким образом, можно предположить, что D16 участвует в связывании некоторых субстратов-акцепторов фосфорила (прежде всего, тимидиловых нуклеотидов).

Наличие аспарагиновой кислоты сразу после “инвариантного” лизина-15 в АТР-связывающем сайте фаговых киназ было отмечено еще Тепляковым с соавторами [29]; авторы работы предположили, что внедрение карбоксильной группы в координационную сферу магния способствует более прочному связыванию катиона и тем самым увеличивает скорость катализа.

По нашим данным, замена треонина в положении 17 на аспарагин приводит к значительному снижению активности на трех субстратах с сохранением достаточно высокой активности на dAMP. Следует отметить, что в случае замены треонина-17 на близкий по природе серин (мутант T17S), в отличие от замены на аспарагин (T17N), активность фермента практически полностью сохраняется. Видимо, наличие ОН-группы аминокислотного остатка в этом положении играет важную роль. Это согласуется с данными об участии серина/треонина Р-петли, обычно следующего за “инвариантным” лизином, в координировании рибозы АТР [5, 30] и в координиро-

вании Mg²⁺ [31], а также в связывании α-фосфорила акцептора [12]. У dNMPKT4 этот остаток треонина, наряду с глицином-13, связывает α-фосфорильную группу АТР, образуя с ней две водородные связи [29].

Интересно, что, в отличие от аденилаткиназ, уридилаткиназ, гуанилаткиназ и прокариотических тимидилаткиназ, у которых в положении X₃ Р-петли находится глицин [17, 32], у dNMK бактериофага Т4 и ему подобных позицию X₃ занимает аргинин. Это характерно для тимидилаткиназ зукариот, причем замена аргинина X₃ на глицин приводит к 200-кратному падению активности фермента [3]. Этот остаток аргинина взаимодействует с γ-фосфорилем АТР; у тимидилаткиназы *E. coli* (с глицином в X₃-положении) данную функцию берут на себя аргинины “длинного” домена LID [3]. У dNMKT5 в положении X₃ находится глицин, что характерно для прокариотических тимидилаткиназ, но “короткий” домен LID не содержит аргининов. Также не выявлено сходства между ферментами бактериофагов Т4 и Т5 в области связывания аденозина донора фосфорила (223–226). Очевидно, имеются отличия в связывании АТР dNMP-киназой бактериофага Т5.

Роль триптофана-150

Замены триптофана-150 были единственными, которые приводили к частичной (W150F) или полной (W150A) потере растворимости белкового продукта. W150A-мутант оказался нерастворимым и полностью содержался в тельцах включения. Мутант W150F также частично агрегировал в тела включения, однако неагрегировавший белок

был хорошо растворим и практически не отличался по активности от природного фермента (табл. 1).

Ранее мы предполагали, что консервативный триптофан-150 может связывать азотистое основание субстрата, исходя из их взаимного расположения. По-видимому, фенилаланин способен функционально замещать триптофан; так, у тимидилаткиназы *Staphylococcus aureus* именно остаток F66 обеспечивает стэкинг-взаимодействие с кольцом пиримидина [32]. В нашем эксперименте мутант W150F также был функционально активен. А вот замена триптофана на аланин сильно ухудшает растворимость белка, поэтому мы предположили, что эта замена мешает нормальному фолдингу. К сожалению, выделить белок из телец включения и определить его активность мы не смогли. Следовательно, роль триптофана-150 в связывании гетероциклического основания акцептора для dNMPKT5 пока остается без экспериментального подтверждения.

Интересно, что α -спираль 7 dNMPK бактериофага T4, в которую входит консервативный триптофан W152, помимо связывания азотистого основания монофосфата, важна для поддержания структуры фермента — отвечает за димеризацию и обеспечивает свободное движение доменов относительно друг друга [29].

Заряженные аминокислоты NMP-связывающего сайта

Замены заряженных аминокислот NMP-связывающего сайта, образованного α -спиральными “стенками” доменов NMPbind и CORE, — аргининов 130 и 172, аспарагиновой кислоты 170 и глутаминовой 176, — ведущие к перемене заряда в активном центре, приводят к практически полной потере ферментативной активности. Можно заключить, что эти заряженные аминокислоты абсолютно необходимы для связывания и фосфорилирования всех четырех канонических dNMPs.

Эти результаты хорошо согласуются с многочисленными литературными данными о роли заряженных аминокислот NMPK в фосфорилировании. Так, мутагенез остатков аргинина, серина и аспарагиновой кислоты SMPK *E. coli* приводит к потере активности или стабильности фермента [38]; мутации с потерей заряда остатков аспарагиновой кислоты ухудшают растворимость и ведут к падению активности UMPK *E. coli* [39]. Кристаллографические исследования структуры SMPK *St. aureus* обнаруживают в активном центре остатки аргининов, аспарагиновой кислоты и треонина [40], а в активном центре GMPK *E. coli* — два остатка аргинина, два — аспарагиновой кислоты, по одному — глутаминовой кислоты, серина и треонина [26]. Отдельно стоит отметить роль остатков аргининов.

Таблица 2. Соотношение активностей мутантов на различных акцепторах фосфорила*

Мутант	dAMP	dTMP	dGMP	dCMP
S13A	100	71.5	26.5	59.5
D16N	100	17.7	37.4	63.4
T17N	100	10.5	24.1	30.0
T17S	100	45.9	57.1	29.7
R130K	100	12.2	32.6	53.9
K131E	100	44.3	39.2	31.9
Q134A	100	11.8	15.9	44.1
G137A	10.5	7.5	<0.1	100
T138A	100	4.3	10.5	14.0
W150F	100	63.3	57.6	29.5
D170N	100	8.8	5.4	7.5
R172I	10	6.4	10	100
E176Q	100	3.3	3.3	3.3
Фермент дикого типа	100	56.4	49.9	35.2

* Активность вычисляли в процентах от максимальной для набора субстратов.

Показано многочисленными исследованиями, что NMP-киназы содержат несколько консервативных остатков аргининов, связывающих α -фосфорил акцептора и β - и γ -фосфорил донора и стабилизирующих переходное состояние [24, 38, 40]. Аргинины и остатки аспарагиновой кислоты участвуют в поддержании структуры активного центра, а также в поддержании его “закрытой” конформации [35]. Мутагенез двух остатков аргинина AMPK *E. coli* полностью инактивирует фермент [25].

Факт потери активности dNMPKT5 на всех субстратах показывает, что сайт связывания NMP единый и данные заряженные аминокислоты критичны для катализа.

Аминокислоты, аналогичные D170 и E176, у dNMPKT4 участвуют в образовании водородных связей с амино- и иминогруппами dGMP [29]. Аргинины 130 и 172, вероятно, связывают α -фосфорильную группу акцептора. Аргинин 132 dNMPK бактериофага T4 (аналог R130 dNMPKT5), кроме того, участвует в связывании сахара — дезоксирибозы — посредством координирования 3'-гидроксила.

Интересно отметить, что аналогом R132 dNMPKT4, выполняющим функцию связывания α -фосфорила NMP, у аденилат-, гуанилат- и уридилаткиназ является аргинин области, фланкирующей N-концевую P-петлю (у разных ферментов это R36, R38, R40, R41, R44, R52) [17, 29]; у dNMPKT5, в отличие от dNMPKT4, в этой области также имеется два остатка аргинина 36 и 37. У цитидилаткиназы *E. coli* в связывании α -фосфорила SMP участвуют два аргинина — 41 и 131 [41]; вероятен такой вариант и для dNMPKT5.

Замены в NMP-связывающем участке домена CORE

Консервативные остатки Q134, G137 и T138 относятся к общей α -спирали CORE. Мы обнаружили, что “аланиновые” замены в этих позициях приводят к значительному снижению активности на некоторых субстратах с сохранением достаточно высокой активности на других (активность уменьшается не на несколько порядков, а в несколько раз). У T138A (как и у другого мутанта про треонину, T17N) сохраняется достаточно высокая активность на dAMP, у G137A – на dCMP, а у Q134A – на обоих этих субстратах.

Интересно, что аналогичный Q134 остаток Q136 киназы бактериофага T4 наряду с аспарагиновой кислотой D141 (аналог E139 бактериофага T5) участвует в поддержании “закрытой” конформации белка после связывания субстрата за счет образования водородных связей с аминокислотными остатками домена LID [29]. Однако проведенный нами анализ последовательностей не выявил никакого сходства dNMPKT5 с dNMPKT4 в области домена LID (остатки 197–211), в отличие от киназ других бактериофагов.

По нашим данным, замена лизина-131 (у dNMPKT4 в этом положении находится аргинин) на глутаминовую кислоту (K131E) – единственная, ведущая к перемене заряда, – не приводит к значительному изменению активности мутанта dNMPKT5 по сравнению с природной формой. Можно предположить, что ϵ -аминогруппа лизина-131, в отличие от гуанидиновой группы “соседнего” аргинина-130, не направлена внутрь сайта связывания акцептора и не участвует в процессе катализа.

Структурные основы субстратной специфичности

Для dNMPKT4 было показано наличие общего для всех акцепторов фосфорилата сайта связывания [42]. На примере dNMPKT5 мы видим, что мутации по ряду позиций (R130, R172, D170 и E176) приводят к катастрофическому падению активности на всех субстратах, и это подтверждает единственность сайта связывания. Однако, непропорциональное падение активности на различных акцепторах при мутациях в ряде других позиций (Q134, G137 и T138) свидетельствует, что, несмотря на наличие единого сайта, распознавание отдельных субстратов-акцепторов фосфорилата – процесс более сложный. Можно предположить, что фосфорильные группы акцепторов связываются одинаковым образом; общим, возможно, является и стэкинг-взаимодействие азотистого основания с консервативным триптофаном 150. Но очевидно, что за специфичность связывания различных акцепторов фосфорилата отвечают разные аминокислоты; какие именно –

нельзя заключить на основании одной имеющейся структуры. В частности, изучение связывания dGMP dNMPKT4 не позволило понять, как связываются пиримидины – hm-dCMP и dTMP [29].

Интересно, что dNMPKT4 не способна фосфорилировать dAMP. Авторы структурного исследования видели причину этого в стерической невозможности связывания аденозина в сайте, в отличие от гуанозина. Однако на примере dNMPKT5 мы наблюдаем большое структурное сходство с dNMPKT4 в сайте связывания монофосфата, при этом dAMP – прекрасный субстрат для dNMPKT5.

Рассуждая о связывании пиримидинов, стоит отметить, что именно пиримидиновые киназы эукариот являются наименее специфичными к акцептору фосфорильной группы; так, UMP-киназа дрожжей может фосфорилировать и CMP, и AMP [35]. Также показано, что пиримидиновые NMPK имеют меньшую энантиоселективность, и *L*-энантиомеры пиримидиновых нуклеотидов успешно моделируются в структуре [43]. UCMРK человека может связывать целый ряд нуклеотидов, хотя не все они являются субстратами [1].

Одной из причин более широкой специфичности пиримидиновых киназ является больший размер NMP-связывающего “кармана”, что уменьшает стерические препятствия для связывания нуклеотидов; другая причина – участие молекул воды, которые могут служить как донором, так и акцептором электронов, таким образом обеспечивая распознавание нескольких субстратов [1, 17, 44]. Для узкоспецифичных пиримидиновых киназ, в частности, для CMPK *E. coli*, напротив, характерен маленький размер CMP-связывающего “кармана” [30]. Можно предположить, что участие водного окружения наряду с большим размером сайта связывания обеспечивает широкую специфичность к субстрату у фаговых NMPK. Вопрос о том, каким конкретно образом обеспечивается специфичность одного фермента к нескольким азотистым основаниям NMP, остается пока открытым. Полученные данные по мутагенезу Р-петли позволяют предполагать возможность участия в этом процессе и некоторых аминокислот АТР-связывающего участка.

Изменения в оптимуме рН

Мы определили рН-оптимумы некоторых dNMPKT5, используя в качестве субстрата dGMP (оптимум природного фермента на этом субстрате лежит в районе 7). На рис. 4 видно, что лишь у одного из мутантов, T17S, оптимум рН совпадает с этим значением. Любопытно, что и удельная активность этого фермента весьма близка природному белку. Для остальных исследованных мутантов оптимум хотя и является также широким, но смещен в более щелочную (7.5–8.5) область по сравнению с исходным ферментом.

Изменения в оптимуме рН нельзя считать выраженными; однако можно отметить их как любопытную тенденцию.

ВЫВОДЫ

1) Замены заряженных аминокислот NMP-связывающего домена нуклеозидмонофосфаткиназы бактериофага T5 – R130, R172, D170 и E176 – приводят к практически полной потере ферментативной активности. Очевидно, эти заряженные аминокислоты абсолютно необходимы для связывания и фосфорилирования всех четырех канонических dNMPs.

2) Остатки аргининов 130 и 172, вероятно, участвуют в связывании γ -фосфорилатора донора и α -фосфорилатора акцептора.

3) D16 АТФ-связывающего сайта участвует в связывании ряда акцепторов, прежде всего dTMP. Наличие OH-группы аминокислотного остатка в положении 17 также важно для катализа.

4) Падение ферментативной активности у частично активных мутантов – G137A, T138A, T17N, Q134A, S13A, D16N – происходит неодинаково для различных акцепторов фосфорильной группы. Таким образом, несмотря на наличие общего сайта для акцепторов, в связывании различных субстратов участвуют разные аминокислоты.

5) Аминокислотные замены W150F, K131E, T17S не приводят к значительному изменению активности ни на одном из субстратов. Остаток триптофана в положении 150 функционально важен для правильного фолдинга белка: его замена на аланин радикально ухудшает растворимость.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В работе использовали Трис, фосфоенолпириват, NADH (восстановленный), пируваткиназу, лактатдегидрогеназу, изопротил- β -D-тиогаляктопиранозид (IPTG) фирмы “Sigma” (США), ДНК-полимеразу Pfu Ultra II (Stratagene, США), T4 ДНК-лигазу и рестриктазу *DpnI* (Fermentas, Литва). Остальные химические реагенты, поставляемые фирмами “Promega” (США), “Fluka” (Швейцария), “Bio-Rad” (США), соответствовали квалификации ос.ч. или х.ч. Носители для хроматографии произведены фирмой TosohHaas (США). Кристаллический яичный лизоцим произведен фирмой “Serva” (Германия).

В качестве матрицы для сайт-направленного мутагенеза использовали полученную нами ранее экспрессионную плазмиду pET532a, сконструированную на основе вектора pET7-7 (Novagen, США) и содержащую ген *dnk*, кодирующий dNMPK бактериофага T5 [14]. Манипуляции с плазмидной ДНК, подготовку компетентных клеток *E. coli* штаммов BL21(DE3) и XL10Gold (Stratagene,

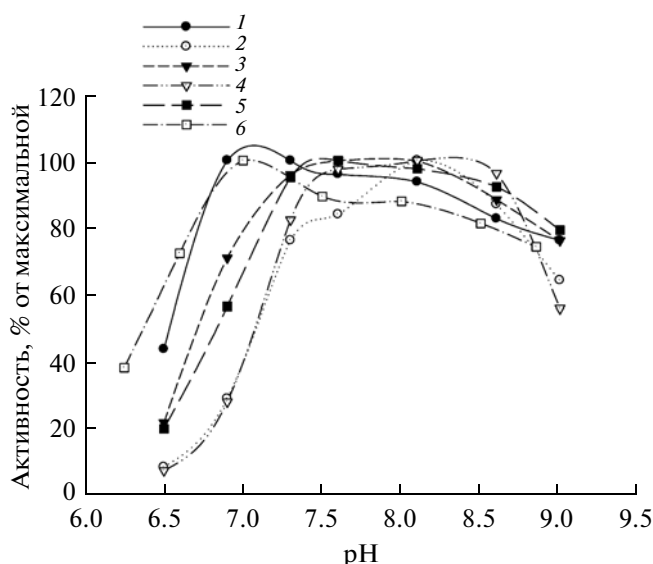


Рис. 4. pH-оптимумы активности мутантных белков T17S (1), D16N (2), T138A (3), Q134A (4), T17N (5), белка дикого типа (6).

США), а также трансформацию осуществляли согласно стандартным методикам [45]. Синтез праймеров для мутагенеза осуществляла компания ЗАО Евроген (Россия). Последовательности праймеров приведены в табл. 3.

Сайт-направленный мутагенез проводили методом, близким к используемому в наборе QuikChange (Stratagene, США) [46]. ПЦР с парами праймеров, указанных в табл. 3, проводили в 50 мкл реакционной смеси. После температурной денатурации плазмидной ДНК и отжига праймеров проводили амплификацию всей плазмиды с использованием высокоточного фермента – термостабильной ДНК-полимеразы Pfu Ultra II. ПЦР-смесь объемом 50 мкл содержала: 10 нг плазмидной ДНК, по 150 нг прямого и обратного праймеров, 100 нМ смесь dNTPs, буфер 1× Pfu UltraII, 2.5 ед. акт. ДНК-полимеразы Pfu UltraII. Температурный режим ПЦР-реакции включал: предварительную денатурацию плазмидной ДНК при 95°C – 2 мин (1-й цикл), денатурацию ДНК при 94°C – 30 с, отжиг праймеров при 55°C – 30 с и достройку ДНК при 68°C – 90 с (2–18 циклы). После проведения 18 циклов ПЦР-смесь инкубировали при 70°C в течение 7 мин и затем охлаждали до комнатной температуры.

В полученную смесь для удаления исходной плазмидной ДНК добавляли 10 ед. акт. эндонуклеазы рестрикции *DpnI*, разрезающей только метилированные сайты, и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Останавливали реакцию прогреванием при 80°C в течение 20 мин. Для трансформации компетентных клеток штамма *E. coli* XL10Gold использовали 1 мкл реакционной смеси. Трансформацию клеток осуществляли методом электропорации при напряжении 2500 В в те-

Таблица 3. Список олигонуклеотидных праймеров, использованных в работе

Название	Последовательность (5'-3')	Производимая замена
T5S13AF	CATGGTGAAGCTGGTGC GGGAAAAGATACC	S13A
T5S13AR	GGTATCTTTTCCCGCACCAGCTTCACCATG	
T5D16NF	GCTGGTTCAGGAAAAAATACCGTTGCAAAATTAATTATCGATTGG	D16N
T5D16NR	CCAATCGATAATTAATTTTGCAACGGTATTTTTTCTGAACCAGC	
T5T17NF	CTGGTTCGGGAAAAGATAACGTTGCAAAATTAATTATCG	T17N
T5T17NR	CGATAATTAATTTTGCAACGTTATCTTTTCCCGAACCAG	
T5T17SF	CTGGTTCGGGAAAAGATAGCGTTGCAAAATTAATTATCG	T17S
T5T17SR	CGATAATTAATTTTGCAACGCTATCTTTTCCCGAACCAG	
T5R130KF	GTTTATTTATTTCTCCGAAGAAAATGTTACAGCTCGTAGGAACG	R130K
T5R130KR	CGTTCCTACGAGCTGTAACATTTTCTTCGGAGAAATAAATAAAC	
T5K131EF	CTCCGAGAGAAATGTTACAGCTCGTAGGAACG	K131E
T5K131ER	CGTTCCTACGAGCTGTAACATTTCTCTCGGAG	
T5Q134AF	CCGAGAAAAATGTTAGCGCTCGTAGGAACGGAG	Q134A
T5Q134AR	CTCCGTTCTACGAGCGCTAACATTTTCTCGG	
T5G137AF	GTTACAGCTGGTAGCAACGGAGCTAGGAAGGCAGC	G137A
T5G137AR	GCTGCCTTCTAGCTCCGTTGCTACCAGCTGTAAC	
T5T138AF	GTTACAGCTGGTAGGAGCGGAGCTAGGAAGGCAGC	T138A
T5T138AR	GCTGCCTTCTAGCTCCGCTCTACCAGCTGTAAC	
T5W150FF	GGTACATGAACGCATTTTCTCATAATTCTGGAGCAATCC	W150F
T5W150FR	GGATTGCTCCAGAATTATGAGGAAAATGCGTTCATGTACC	
T5W150AF	GGTACATGAACGCATTGCGCTCATAATTCTGGAG	W150A
T5W150AR	CTCCAGAATTATGAGCGCAATGCGTTCATGTACC	
T5D170NF	GTCGCCGTAATAACAAATGTGAGATTCCCCAATGAAG	D170N
T5D170NR	CTTCATTGGGGAATCTCACATTTGTTATTACGGCGAC	
T5R172IF	GCCGTAATAACAGATGTGATCTTCCCCAATGAAGGAGAG	R172I
T5R172IR	CTCTCCTTCATTGGGGAAGATCACATCTGTTATTACGGC	
T5E176QF	GTGAGATTCCCCAATCAAGGAGAGTTACTCAGAGAGACG	E176Q
T5E176QR	CGTCTCTCTGAGTAACTCTCCTTGATTGGGGAATCTCAC	

чение 5–5.5 мс на приборе MicroPulser (Bio-Rad, США). Селекцию рекомбинантных клонов проводили на LB-агаре в присутствии ампициллина (100 мкг/мл). Из отобранных случайным образом 2–3 клонов стандартными методами выделяли плазмидную ДНК и анализировали ее на наличие целевой мутации секвенированием соответствующего участка гена *dnk*. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer. Эффективность получения целевых мутантов доходила до 80% от общего количества проанализированных клонов. Кроме секвенирования плазмидной ДНК, целостность структуры мутантов подтверждали экспрессией полученных конструкций в штамме *E. coli* BL21(DE3).

Культивирование бактерий. Штаммы *Escherichia coli* В и BL21(DE3) были получены из Всероссийской Коллекции Микроорганизмов (ИБФМ

РАН). Бактерии выращивали в жидких и агаризованных средах состава LB, содержащих 100 мкг/мл ампициллина.

Экспрессию целевого фермента осуществляли в клетках *E. coli* BL21(DE3), содержащих мутантные варианты плазмиды. Клеточную биомассу наращивали при 37°C и интенсивном перемешивании (200 об./мин) в течение 14–18 ч (ночь) в 2 мл среды LB с добавлением глюкозы до концентрации 0.5%. Ночную культуру (1 мл) переносили в 100 мл среды без глюкозы и наращивали до достижения оптической плотности 1 ОЕ₅₅₀. Индуцировали экспрессию целевого фермента добавлением IPTG до концентрации 0.2 мМ. Через 2.5 ч после индукции клетки собирали центрифугированием при 6000 g в течение 10 минут.

Выделение и очистка белка. Клетки *E. coli* BL21(DE3) (1–1.5 г) суспендировали в 10 мл буфера, содержащего 40 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 120 мМ NaCl, 1 мМ EDTA и 20 мМ β-меркаптоэтанол (буфер А). Суспензию клеток разрушали ультразвуком мощностью 75 Вт в течение 1 мин (2 раза по

30 с). Суспензию центрифугировали при 14000 *g* в течение 20 мин. Супернатант (9.5 мл) наносили на колонку с DEAE-Тоуорепарл 650М объемом 9 мл, уравновешенную буфером А. Белок элюировали посредством хроматографии линейным градиентом концентрации хлористого натрия (0.12–0.5 М) объемом 100 мл в том же буфере. Целевую фракцию белка затем наносили на 1-мл колонку с Тоуорепарл AF-Red 650М, уравновешенную буфером А; белок элюировали буфером А, содержащим 1 мМ АТР. Наличие целевого белка во фракциях определяли электрофорезом в ПААГ по методу Лэммли [47] в условиях, указанных ниже.

Активность ферментов определяли спектрофотометрическим методом, основанным на сопряжении образования нуклеозиддифосфатов с окислением NADH [48]. Полная реакционная смесь содержала в конечном объеме 1 мл: 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 80 мМ КСl, 8 мМ MgCl₂, 2 мМ EDTA, 0.8 мМ PEP, 0.2 мМ АТР, 0.1 мМ NADH+H⁺, 2 мМ дезоксирибонуклеозидмонофосфаты, 20 ед. акт. лактатдегидрогеназы, 17 ед. акт. пируваткиназы и исследуемый фермент (0.02–0.2 ед. акт.). Реакцию вели в акриловой кювете при 25°C в течение 3–5 мин. Скорость окисления NADH+H⁺ измеряли на спектрофотометре по уменьшению оптической плотности при 340 нм. За 1 ед. акт. принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль монофосфата в 1 мин при 25°C.

Стандартные аналитические методы. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорд [49], используя яичный лизоцим в качестве стандарта. Образцы белка анализировали в 12% ПААГ по методу Лэммли [47], используя стандартные маркеры (*M*, кДа): β-лактальбумин (14.2), соевый ингибитор трипсина (20.1), карбоангидразу (29.0), овальбумин (45), бычий сывороточный альбумин (66.0) и фосфорилазу В (94.0). Гели окрашивали Ку-масси бриллиантовым синим G-250 (Sigma, St. Louis, MO).

Компьютерные методы. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности анализировали при помощи программ Dm5 и Gene Runner v.3.0, подбор праймеров для клонирования осуществляли при помощи программы Oligo4. Для анализа аминокислотных последовательностей использовали программу BLAST Search [50] с сервера National Center of Biotechnology Information, National Library of Medicine, США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). В работе использовали компьютерно-графический анализ с помощью третьей версии пакета программ Cn3D — <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/CN3D/cn3d/shtml>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Topalis D., Kumamoto H., Amaya Velasco M.F., Dugué L., Haouz A., Alexandre J.A., Gallois-Montbrun S., Alzari P.M., Pochet S., Agrofoglio L.A., Deville-Bonne D. // FEBS J. 2007. V. 274. P. 3704–3714.
2. Lavie A., Ostermann N., Brundiers R., Goody R.S., Reinstein J., Konrad M., Schlichting I. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 14045–14050.
3. Brundiers R., Lavie A., Veit T., Reinstein J., Schlichting I., Ostermann N., Goody R.S., Konrad M. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 35289–35292.
4. Guettari N., Loubière L., Brisson E., Klatzmann D. // Virology. 1997. V. 235. P. 398–405.
5. Li Y., Spangenberg O., Paarmann I., Konrad M., Lavie A. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 4159–4165.
6. Dreusicke D., Karplus P.A., Schulz G.E. // J. Mol. Biol. 1988. V. 199. P. 359–371.
7. Abele U., Schulz G.E. // Protein Sci. 1995. V. 4. P. 1262–1271.
8. Müller-Dieckmann H.J., Schulz G.E. // J. Mol. Biol. 1994. V. 236. P. 361–367.
9. Briozzo P., Evrin C., Meyer P., Assairi L., Joly N., Barzu O., Gilles A.M. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 25533–25540.
10. Ostermann N., Segura-Peña D., Meier C., Veit T., Monnerjahn C., Konrad M., Lavie A. // Biochemistry. 2003. V. 42. P. 2568–2577.
11. Bucurenci N., Sakamoto H., Briozzo P., Palibroda N., Serina L., Sarfati R.S., Labesse G., Briand G., Danchin A., Barzu O., Gilles A.M. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 2856–2862.
12. Sekulic N., Shuvalova L., Spangenberg O., Konrad M., Lavie A. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 30236–30243.
13. Okajima T., Tanizawa K., Fukui T. // J. Biochem. 1993. V. 114. P. 627–633.
14. Mikoulinckaia G.V., Zimin A.A., Feofanov S.A., Miroshnikov A.I. // Prot. Exp. Purif. 2004. V. 33. P. 166–175.
15. Антонов К.В., Есипов Р.С., Гуревич А.И., Чувиковский Д.В., Микулинская Г.В., Феофанов С.А., Мирошников А.И. // Биоорганическая химия. 2003. Т. 29. С. 616–622. [Antonov K.V., Esipov R.S., Gurevich A.I., Chuvikovskii D.V., Mikulinskaia G.V., Feofanov S.A., Miroshnikov A.I. // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2003. V. 29. P. 560–565.]
16. Скоблов А.Ю., Микулинская Г.В., Таран С.А., Мирошников А.И., Феофанов С.А., Скоблов Ю.С. // Биоорганическая химия. 2009. Т. 35. С. 816–821. [Skoblov A.Yu., Mikulinskaia G.V., Taran S.A., Miroshnikov A.I., Feofanov S.A., Skoblov Yu.S. // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2009. V. 35. P. 734–738.]
17. Yan H., Tsai M.D. // Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol. 1999. V. 73. P. 103–134.
18. Lu Q., Wang J. // J. Am. Chem. Soc. 2008. V. 130. P. 4772–4783.
19. Liu R., Xu H., Wei Z., Wang Y., Lin Y., Gong W. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. V. 379. P. 92–97.
20. Fukami-Kobayashi K., Nosaka M., Nakazawa A., Go M. // FEBS Lett. 1996. V. 385. P. 214–220.
21. Daily M.D., Phillips G.N. Jr., Cui Q. // J. Mol. Biol. 2010. V. 400. P. 618–631.
22. Adkar B.V., Jana B., Bagchi B. // J. Phys. Chem. 2011. V. 115. P. 3691–3697.
23. Schlauderer G.J., Proba K., Schulz G.E. // J. Mol. Biol. 1996. V. 256. P. 223–227.

24. Bellinzoni M., Haouz A., Graña M., Munier-Lehmann H., Shepard W., Alzari P.M. // *Protein Sci.* 2006. V. 15. P. 1489–1493.
25. Krishnamurthy H., Lou H., Kimple A., Vieille C., Cukier R.I. // *Proteins.* 2005. V. 58. P. 88–100.
26. Hible G., Daalova P., Gilles A.M., Cherfils J. // *Biochimie.* 2006. V. 88. P. 1157–1164.
27. Bello L.J., Bessman M.J. // *J. Biol. Chem.* 1963. V. 238. P. 1777–1787.
28. Duckworth D.H., Bessman M.J. // *J. Biol. Chem.* 1967. V. 242. P. 2877–2885.
29. Teplyakov A., Sebastiao P., Obmolova G., Perrakis A., Brush G.S., Bessman M.J., Wilson K.S. // *EMBO J.* 1996. V. 15. P. 3487–3497.
30. Krell T., Maclean J., Boam D.J., Cooper A., Resmini M., Brocklehurst K., Kelly S.M., Price N.C., Laphorn A.J., Coggins J.R. // *Protein Sci.* 2001. V. 10. P. 1137–1149.
31. Kraft L., Sprenger G.A., Lindqvist Y. // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 318. P. 1057–1069.
32. Kotaka M., Dhaliwal B., Ren J., Nichols C.E., Angell R., Lockyer M., Hawkins A.R., Stammers D.K. // *Protein Sci.* 2006. V. 15. P. 774–784.
33. Ke P.Y., Kuo Y.Y., Hu C.M., Chang Z.F. // *Genes Dev.* 2005. V. 19. P. 1920–1933.
34. Dreusicke D., Schulz G.E. // *FEBS Lett.* 1986. V. 208. P. 301–304.
35. Müller-Dieckmann H.J., Schulz G.E. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 246. P. 522–530.
36. Traut T.W. // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 222. P. 9–19.
37. Zhou L., Thornburg R. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1998. V. 358. P. 297–302.
38. Ofiteru A., Bucurenci N., Alexov E., Bertrand T., Briozzo P., Munier-Lehmann H., Gilles A.M. // *FEBS J.* 2007. V. 274. P. 3363–3373.
39. Bucurenci N., Serina L., Zaharia C., Landais S., Danchin A., Bârză O. // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. P. 473–477.
40. Dhaliwal B., Ren J., Lockyer M., Charles I., Hawkins A.R., Stammers D.K. // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* 2006. V. 62. P. 710–715.
41. Briozzo P., Golinelli-Pimpaneau B., Gilles A.M., Gaucher J.F., Burlacu-Miron S., Sakamoto H., Janin J., Bârză O. // *Structure.* 1998. V. 6. P. 1517–1527.
42. Brush G.S., Bessman M.J. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 1603–1609.
43. Alexandre J.A., Roy B., Topalis D., Pochet S., Périgaud C., Deville-Bonne D. // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. 4895–4904.
44. Scheffzek K., Kliche W., Wiesmüller L., Reinstejn J. // *Biochemistry.* 1996. V. 35. P. 9716–9727.
45. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor, 1989. 475 p.
46. Papworth C., Bauer J.C., Braman J., Wright D.A. // *Strategies.* 1996. V. 9. P. 3–4.
47. Laemmli U.K. // *Nature.* 1968. V. 170. P. 5259–5268.
48. Bessman M.J. *Methods in Enzymology.* New York and London: Academic Press, 1963. V. VI. P. 166–177.
49. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
50. Altschul S.F., Madden T.L., Scheffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3389–3402.

Investigation of Active Center of Deoxynucleoside Monophosphate Kinase of Bacteriophage T5 by Site-Directed Mutagenesis

G. V. Mikoulinskaia*^{*,#}, S. A. Taran*, Yu. S. Skoblov**^{*,#}, S. A. Feofanov*

[#]Phone: +7 (4967) 73-17-80; e-mail: mikulinskaya@bibch.ru

*Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, pr. Nauki 6, Pushchino, 142290 Russia

**Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

Based on the computer model of active center of bacteriophage T5 deoxyribonucleoside monophosphate kinase amino acid residues essential for the enzyme activity were determined. As the result of site-directed mutagenesis, cloning and expression of the gene in *E. coli* series of proteins were obtained with single amino acid substitutions of conservative active center residues—S13A, D16N, T17N, T17S, R130K, K131E, Q134A, G137A, T138A, W150F, W150A, D170N, R172I, E176Q. Electrophoretically homogeneous preparations of mutant forms were purified using ion exchange and affinity chromatographic steps. Measuring of the specific enzyme activities of these enzymes for the natural acceptors of phosphoryl group (dAMP, dCMP, dGMP, dTMP) revealed that substitutions of charged residues of NMP-binding domain—namely, R130, R172, D170 и E176—lead to almost complete loss of enzyme activity. It was shown that presence of OH-group at position 17 is also important for catalytic activity. Based on the changes in specific activities we suppose that arginine residues at positions 130 and 172 participate in binding of γ -phosphoryl of donor and α -phosphoryl of acceptor. Also, aspartic acid at 16 position of ATP-binding site (P-loop) probably assists in the binding of acceptor, first of all dTMP. Unequal decrease in enzyme activities for different substrates of partially active mutants—G137A, T138A, T17N, Q134A, S13A, D16N—indicate that in the binding of various substrates different amino acid residues take part.

Keywords: nucleoside monophosphate kinase, bacteriophage T5, site-directed mutagenesis