

ВЫРАЩИВАНИЕ КРИСТАЛЛОВ ФОСФОПАНТЕТЕИН АДЕНИЛИЛТРАНСФЕРАЗЫ, КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Т И ТИМИДИНФОСФОРИЛАЗЫ НА МЕЖДУНАРОДНОЙ КОСМИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ МЕТОДОМ ВСТРЕЧНОЙ ДИФФУЗИИ В КАПИЛЛЯРЕ

© 2011 г. И. П. Куранова¹, Е. А. Смирнова¹, Ю. А. Абрамчик^{1,2}, Л. А. Чупова², Р. С. Есипов², В. Х. Акпаров³, В. И. Тимофеев¹, М. В. Ковальчук^{1,4}

¹Институт кристаллографии РАН, Москва

E-mail: inna@ns.crys.ras.ru

²Институт биоорганической химии РАН, Москва

³ГУНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

⁴Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва

Поступила в редакцию 27.04.2011 г.

Кристаллы фосфопантетеин аденилилтрансферазы из *Mycobacterium tuberculosis*, тимидинфосфорилазы из *Escherichia coli*, карбоксипептидазы Т из *Thermoactinomyces vulgaris* и ее мутантных форм, а также кристаллы комплексов этих белков с функциональными лигандами и ингибиторами были выращены на Международной космической станции методом встречной диффузии в капилляре в экспериментальном модуле Kibo. На источнике синхротронного излучения SPring 8 от полученных кристаллов были собраны рентгенодифракционные наборы высокого разрешения, пригодные для установления пространственных структур закристиализованных белков при высоком разрешении. Приведены условия кристаллизации белков и характеристики собранных от них рентгенодифракционных наборов. Выращенные в невесомости кристаллы давали дифракционную картину до более высокого разрешения, чем выращенные в тех же условиях на Земле.

ВВЕДЕНИЕ

Выращивание кристаллов белков в условиях невесомости является одним из способов, позволяющих повысить качество дифракционной картины кристаллов [1, 2]. В невесомости благодаря отсутствию конвекционных потоков транспорт вещества к растущему кристаллу осуществляется преимущественно посредством диффузии. Отсутствие седиментации и сферическая геометрия диффузионного поля способствуют росту наиболее изометричных кристаллов. При отсутствии силы тяжести вокруг растущего кристалла устанавливается стабильный концентрационный градиент молекул белка и примесей, обеспечивающий, с одной стороны, усиленную сегрегацию примесей, с другой — позволяющий белковым молекулам включаться в кристаллизационную решетку в оптимальной ориентации [3, 4].

Благодаря стабильному концентрационному градиенту вокруг кристалла в невесомости снижается вероятность вторичной нуклеации, что позволяет избежать срастания кристаллов и образования друз. Отмечены случаи, когда в невесомости удавалось получать монокристаллы вместо двойников в наземных условиях [5].

Выращивание кристаллов белков в невесомости проводится в специально разработанном для этих целей оборудовании, но при этом использу-

ются те же методы, что и на Земле. Однако было показано, что наиболее распространенный при единичной гравитации метод диффузии паров растворителя в условиях микрогравитации имеет определенные недостатки: из-за присутствия свободной поверхности при увеличении размера кристалла в капле вокруг него возникают конвекционные потоки (конвекция Марангони), отрицательно влияющие на качество кристалла [6].

Поэтому для экспериментов в невесомости предпочитают использовать метод свободной диффузии через поверхность раздела белковый раствор/раствор осадителя, а также метод встречной диффузии. Метод свободной диффузии был использован нами при выращивании кристаллов белков на Международной космической станции (МКС) в кристаллизаторе Модуль 1 [7, 8]. В настоящей работе описано выращивание кристаллов фосфопантетеин аденилилтрансферазы из *Mycobacterium tuberculosis* (PPAT Mt), тимидинфосфорилазы (ТФ) из *Escherichia coli*, карбоксипептидазы Т (КПТ) из *Thermoactinomyces vulgaris* и ее мутантных форм, а также кристаллов комплексов этих белков с функциональными лигандами и ингибиторами методом встречной диффузии в капилляре на МКС в кристаллизационном модуле Kibo японского аэрокосмического агентства (JAXA). Эксперименты проведены при

участии сотрудников японского аэрокосмического агентства JAXA.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление фосфопантетеин аденилилтрансферазы из *Mycobacterium tuberculosis*. Рекомбинантная РРАТ Мт была приготовлена так, как описано в [9]. Авирулентный штамм-продуцент *E. coli* ER2566/pER_РРАТ культивировали в среде УТ, содержащей 50 мг/мл ампициллина, и выращивали при 37°C. Клетки отделяли центрифугированием. После дезинтегрирования ультразвуком гомогенат центрифугировали. Содержащий белок супернатант фракционировали последовательно на Sepharose Q XL, на Sepharose Q НР в градиенте NaCl. Очистку белка завершали гель-фильтрацией на Sepharose S 200. Раствор белка в NERES/HCl буфере, рН 8, хранили замороженным при температуре –80°.

Рекомбинантная карбоксипептидаза Т из *Thermotactinomyces vulgaris* (КПТwt) была получена путем клонирования гена КПТ в *E. coli* с последующей ренатурацией белка из телец включения и очисткой аффинной хроматографией на *n*-аминобензилянтарной кислоте, связанной с активированной сефарозой [10].

Мутантные варианты гена *pro-cpT* получали по стандартной схеме направленного ПЦР мутагенеза, наличие мутаций подтверждали секвенированием гена. Экспрессию мутантных форм проводили в клетках *E. coli* BL21(DE3)pLysS, согласно инструкции производителя Novagene. Активацию проКПТ5 проводили с использованием субтилизина. Активированную КПТ5 очищали на колонке с аффинным сорбентом СABS-сефарозой и концентрировали на мембране Миллипор [11]. КПТ5 содержала следующие замены в центре первичной специфичности: G215S, A251G, T257A, D260G, T262D.

Рекомбинантная тимидинфосфорилаза *E. coli* была получена в бактериальном штамме *E. coli* BL21(DE3)/pER-Thy1. На первой стадии очистки супернатант подвергался двойному высаливанию сульфатом аммония. Дальнейшая очистка белка проведена посредством анионообменной хроматографии на сорбенте Sepharose Q НР и гидрофобной хроматографией на сорбенте Phenyl Sepharose НР [12].

Первоначальные условия кристаллизации для всех белков были найдены с использованием метода диффузии паров растворителя. Найденные условия были модифицированы применительно к методу встречной диффузии посредством варьирования концентраций белка и осадителя.

Кристаллизация методом встречной диффузии в капилляре. Использовали стеклянные капилляры фирмы Confocal Science Inc. длиной 60 мм и внут-



Рис. 1. Капилляр с раствором белка и с присоединенной к капилляру силиконовой трубкой, заполненной агарозным гелем.

ренним диаметром 0.3 или 0.5 мм с присоединенной к каждому из них силиконовой трубкой, наполненной агарозным гелем. Для оптимизации условий использовали капилляры с внутренним диаметром 0.3 мм, для экспериментов в невесомости и контрольных наземных экспериментов использовали капилляры с внутренним диаметром 0.5 мм.

Для заполнения капилляра каплю белкового раствора объемом 3–5 мкл (капилляр диаметром 3 мм) или 8–10 мкл (капилляр диаметром 0.5 мм) помещали на поверхность силиконированного стекла и, прикасаясь концом капилляра к капле, вводили раствор в капилляр. Удаленный от раствора конец капилляра герметически закрывали, погружая его в пластилиновую замазку. На конец капилляра с раствором надевали силиконовую трубку длиной 15 мм, заполненную 1%-ным агарозным гелем (рис. 1). При постановке эксперимента в наземных условиях раствор осадителя помещали в пробирку (так называемый GT-метод) [13]. Трубку острым лезвием укорачивали до желаемой длины, после чего капилляр с трубкой опускали в пробирку с закручивающейся пробкой, содержащую 1 мл раствора осадителя. При этом трубка с гелем целиком погружалась в раствор (рис. 2). Через каждые 4–6 дней капилляр вынимали из пробирки и под микроскопом наблюдали за появлением кристаллов и их ростом; цифровой камерой, присоединенной к микроскопу, фотографировали кристаллы в капиллярах.

Заполнение капилляров и сборка кристаллизационного бокса JCB для отправки на МКС. Для проведения кристаллизационного эксперимента в невесомости были приготовлены растворы белков и осадителей, состав и концентрация компонентов в которых соответствовала найденным оптимальным условиям для роста кристаллов.

Предполетное заполнение капилляров приготовленными растворами, сборка, герметизация и упаковка кристаллизационных боксов японского аэрокосмического агентства (JCB – JAXA Crystallization Box) для отправки на МКС проводилась представителями японского аэрокосмического агентства JAXA по протоколу, разработанному в JAXA [14].

Стеклообразный капилляр диаметром 0.5 мм и длиной 60 мм заполняли белковым раствором до



Рис. 2. GT-метод кристаллизации: капилляр с надетой на него гелевой трубкой в пробирке с раствором осадителя.

высоты 30 мм, один конец капилляра запечатывали пластилином, на другой одевали заполненную 1%-ным агарозным гелем силиконовую трубку, предварительно в течение суток вымоченную в растворе осадителя. В каждый из двух соединенных между собой пластиковых цилиндров емкостью 180 мкл вносили половинный объем осадителя и в каждый цилиндр вставляли заполненный белковым раствором капилляр с присоединенной к нему трубкой. При этом раствор осадителя, частично вытесняясь из цилиндра, заполнял весь его объем. Нижние отверстия обоих цилиндров (дно цилиндров) закрывали пробками с микроотверстиями для удаления воздуха и избытка раствора, затем тщательно герметизировали с помощью клея. По шесть цилиндров с капиллярами помещали в полиэтиленовые футляры, содержащие небольшое количество воды, футляры герметизировали и укладывали в контейнеры (рис. 3). Контейнеры доставляли на космодром в термоизолированной сумке. Контроль за температурой осуществляли с помощью пластиковых пакетов, содержащих гексадекан и гептадекан.

Использованные в полетах условия роста кристаллов белков и их комплексов с функциональными лигандами и ингибиторами, в которых получены кристаллы наилучшего качества, приведены в табл. 1.

Визуальная оценка морфологии кристаллов и их расположения в капиллярах. После завершения полета боксы с капиллярами просматривали и фотографировали под микроскопом Олимпус, не доставая их из пластиковых пакетов, после чего снова помещали в контейнеры и отправляли на



Рис. 3. Кристаллизационный бокс JAXA (JCB): шесть капилляров уложены в бокс, помещенный в герметизированный пластиковый пакет.

синхротрон SPring 8 (Япония) для распаковки и получения дифракционных наборов.

Приготовление консервирующих растворов и криоразтворов для выгрузки и съемки кристаллов. Для каждого вида кристаллов были приготовлены соответствующие крио- и консервирующие растворы. Консервирующие растворы для выгрузки кристаллов содержали повышенный процент растворителя по сравнению с маточным раствором, в котором выросли соответствующие кристаллы. Растворы для заморозки кристаллов перед съемкой содержали компоненты той же концентрации, что и консервирующие растворы, плюс 20–25% глицерина.

Получение дифракционных наборов на синхротроне SPring 8. Для выгрузки кристалла капилляра под микроскопом разрезали таким образом, чтобы выбранный для сбора данных кристалл находился в коротком отрезке капилляра. Кристалл удаляли из капилляра, осторожно вымывая его в каплю консервирующего раствора током консервирующего раствора через плотно прижатый к капилляру наконечник пипетки. Кристалл из консервирующего раствора вылавливали нейлоновой петлей на магнитном держателе, на несколько секунд переносили в содержащий глицерин криоразтвор, после чего замораживали в парах азота. Дифракционные наборы при температуре 100 К собирали на синхротроне SPring-8 (Япония), станция BL41XU. В качестве детектора использовались CCD-детекторы MX225HE или QUANTUM-315.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Целью экспериментов, проведенных совместно с японским аэрокосмическим агентством JAXA, было выращивание в условиях невесомости методом встречной диффузии кристаллов белков высокого дифракционного качества.

Главная особенность метода встречной диффузии, предложенного Гарсиа-Руисом и Морено [15], состоит в том, что при кристаллизации смешивание раствора белка с раствором осадителя

Таблица 1. Условия кристаллизации белков в невесомости в полетах JAXA1–JAXA3

Белок, концентрация	Состав раствора белка	Состав раствора осадителя	Размеры кристалла, мм
PPAT Mt, конц. 12 мг/мл	10 mM HEPES, pH 8.0, 0.15 M NaCl, 1 mM ДТТ	40 mM какодилат, pH 5.5, 20 mM MgCl ₂ , 20 mM [Co(NH ₃) ₆]Cl ₃ , 15% MPD	0.15–0.25
PPAT Mt/CoA, конц. 12 мг/мл	10 mM HEPES, pH 8.0, 0.15 M NaCl, 14 mM CoA, 1 mM ДТТ	20 mM какодилат, pH 5.5, 5 mM MgCl ₂ , 0.075 M NaCl, 12 % МПД, 5 mM HEPES pH 8. 20 mM гексамина кобальта, 14 mM CoA.	0.15–0.30
PPAT Mt/DPCoA, конц. 16 мг/мл	10 mM HEPES, pH 8.0, 0.15 M NaCl, 14 mM DPCoA, 1 mM ДТТ	20 mM какодилат, pH 5.5, 5 mM MgCl ₂ , 0.075 M NaCl, 15 %-ный МПД, 5 mM HEPES pH 8. 20 mM гексамина кобальта, 14 mM DPCoA	0.20–0.45
PPAT Mt/АТР (I), конц. 12 мг/мл	10 mM HEPES, pH 8.0, 0.15 M NaCl, 14 mM АТР, 1 mM ДТТ	20 mM какодилат, pH 5.5, 5 mM MgCl ₂ , 0.075 M NaCl, 12 %-ный МПД, 5 mM HEPES pH 8. 20 mM гексамина кобальта, 14 mM АТР	0.20–0.35
PPAT Mt/АТР (II), конц. 10 мг/мл	10 mM HEPES, pH 8.0, 0.15M NaCl, 14 mM АТР	0.1 M NaAc, pH 5.0, 10 mM MgCl ₂ , 5 mM HEPES pH 8.0, 0.075 M NaCl, 14 mM АТР, 1.1 M сульфат аммония	0.05–0.20
КПТ wt, конц. 10 мг/мл	250 mM NaCl, 10 mM Mes/NaOH, pH 6	1.6 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5% MPD, 50 mM Mes/NaOH pH6.0	0.35–0.45
КПТ wt/Z-L-Lys, конц. 10 мг/мл	250 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂ , 10 mM Mes/NaOH, pH 6.0	1.4 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5% MPD, 50 mM Mes/NaOH, pH 6.0, 18 мг/мл Z-L-Lys	0.15–0.35
КПТ wt/ВОС-L-Leu, конц. 10 мг/мл	250 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂ , 10 mM Mes/NaOH, pH 6.0	1.4 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5% MPD, 50 mM Mes/NaOH, pH 6.0, 2.4 mM ВОС-L-Leu	0.20–0.35
КПТ 5, конц. 11.4 мг/мл	250 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂ , 1 mM ZnAc, 10 mM Mes/NaOH, pH 6.0	1.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 250 mM NaCl, 5% MPD, 1 mM CaCl ₂ , 1 mM ZnAc, 50 mM Mes/NaOH, pH 6.0	0.1–0.4
КПТ 5, Z-L-Lys, конц. 11.4 мг/мл	250 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂ , 1 mM ZnAc, 10 mM Mes/NaOH, pH 6.0	1.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5% MPD, 50 mM Mes/NaOH, pH 6.0, 1 mM CaCl ₂ , Z-L-Lys 18 мг/мл	0.3–0.4
КПТ 5/ВОС-L-Leu, конц. 11.4 мг/мл	250 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂ , 1 mM ZnAc, 10 mM Mes/NaOH, pH 6.0	1.4 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5% MPD, 50 mM Mes/NaOH, pH 6.0, 1 mM CaCl ₂ , 1 mM ZnAc ВОС-L-Leu 2.4 мг/мл	0.3–0.4
Тимидинфосфорилаза из <i>E. coli</i> , конц. 10 мг/мл	0.1 M KH ₂ PO ₄ , pH 7.3, 0.04% NaN ₃	25 % (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1 M цитрат Na, pH 5.5, 0.04% NaN ₃	0.15–0.4
Тимидинфосфорилаза из <i>E. coli</i> /ингибитор 1, конц. 17 мг/мл	0.025 M KH ₂ PO ₄ , pH 7.3, 0.04% NaN ₃ , 2 mM 3'-NH ₂ -2'- F-2',3'-ddT	30% (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1 M цитрат Na, pH 5.5, 0.04% NaN ₃ , 2 mM 3'-NH ₂ -2'-F-2',3'-ddT	0.15–0.5
Тимидинфосфорилаза из <i>E. coli</i> /ингибитор 2, конц. 35 мг/мл	0.05 M KH ₂ PO ₄ , pH 7.3, 0.04% NaN ₃ , 4 mM 3'-NH ₂ - 2',3'-ddT	25%, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1 M цитрат Na, pH 5.5, 0.04% NaN ₃ , 4 mM 3'-NH ₂ -2',3'-ddT	0.5

происходит не непосредственно через поверхность раздела между растворами белка и осадителя, а через слой геля, помещенного между ними. Сам процесс кристаллизации происходит в капилляре. Благодаря введению гелевой пробки замедляется процесс диффузии осадителя в белковый раствор и даже при единичной гравитации в капилляре уменьшаются конвекционные потоки [4]. Вдоль капилляра устанавливаются разнонаправленные концентрационные градиенты белка и осадителя. Кристаллы, появляющиеся на разных расстояниях от входа в капилляр, растут при разных соотношениях концентраций белка и осадителя, благодаря чему в одном капилляре удается протестировать несколько условий роста.

Для проведения экспериментов по росту кристаллов методом встречной диффузии в невесомости испанскими исследователями был предложен кристаллизационный бокс Granada Crystallization box (GCB) [16]. В GCB кристаллы выращивали непосредственно в тонкостенном рентгеновском капилляре, один конец которого был запечатан вакуумной смазкой, а другой погружен в пропитанный буферным раствором слой агарозного геля, находящегося в пластиковом боксе и покрытого раствором осадителя. Пластиковый бокс вмещал шесть капилляров.

Японские исследователи предложили модифицированный вариант кристаллизационного

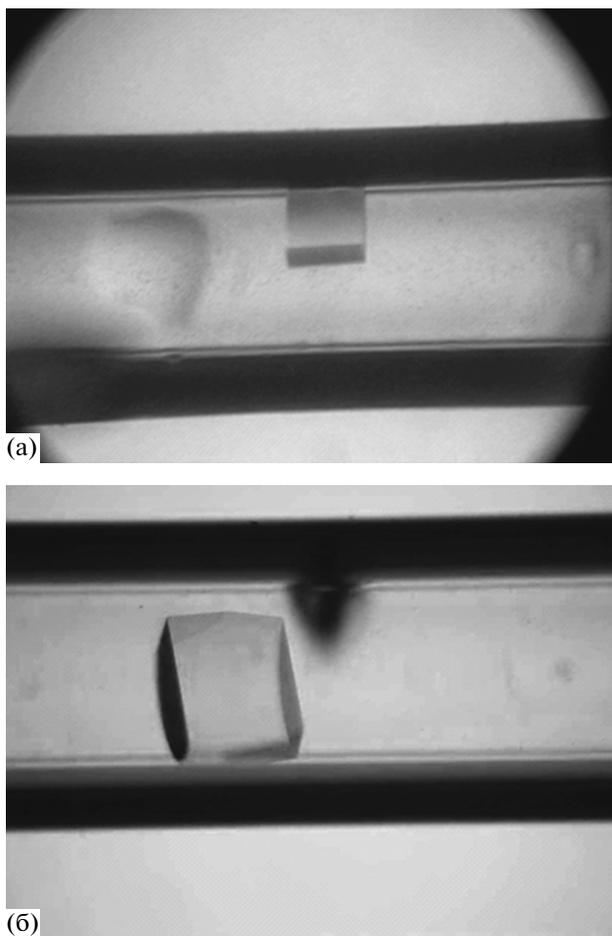


Рис. 4. Кристаллы PRAT Mt: а – свободного фермента, б – комплекса с DPCoA.

устройства для метода встречной диффузии, названного JAXA Crystallization box (JBC) [14]. Вместо хрупких рентгеновских капилляров для кристаллизации используются толстостенные стеклянные капилляры диаметром 0.3 или 0.5 мм. Агарозный гель полимеризуется в длинной силиконовой трубке, после чего трубка с гелем разрезается на части длиной до 1.5 мм. Отрезок трубки с гелем одевается на конец капилляра. Капилляр с трубкой, через которую должен диффундировать осадитель, погружают в малый объем раствора осадителя, находящегося в цилиндрической трубке, оба отверстия которой тщательно герметизируют. Длину одетой на капилляр силиконовой трубки с гелем можно изменять, что позволяет регулировать начальное время кристаллизации. Модифицированный таким образом вариант метода имеет ряд преимуществ. Поскольку трубка с гелем присоединяется отдельно к каждому капилляру, для них можно выбрать разные осадители. Малый объем геля в трубке позволяет уменьшить объем осадителя, необходимый для проведения эксперимента. Последнее обстоятельство особенно важно в тех случаях, когда для получения кристаллов комплексов белка с нековалентно связан-

ными лигандами в раствор осадителя необходимо добавлять дорогостоящий лиганд.

Для оценки изменений концентрации белка и осадителя в любой точке капилляра в зависимости от времени Н. Tanaka и др. была разработана расчетная программа (1-D simulation program) [13]. В качестве математической модели для описания диффузии белка и осадителя в геле и в капилляре были использованы дифференциальные уравнения, описывающие одномерный диффузионный процесс, причем коэффициент диффузии оценивается, исходя из данных о молекулярном весе и исходной концентрации белка и осадителя. Рассчитанные таким методом концентрации белка и осадителя, при которых появились кристаллы, можно использовать как стартовые условия кристаллизации для последующих экспериментов.

В данной работе первоначальный поиск условий кристаллизации белков проводили методом диффузии паров растворителя в висячей капле. Найденные условия оптимизировали применительно к методу встречной диффузии в капиллярах диаметром 0.3 мм, в которые вносили по 3 мкл белкового раствора, после чего капилляры помещали в пробирку с завинчивающейся крышкой, содержащую 0.5–1.0 мл раствора осадителя.

Кристаллизационные эксперименты на МКС проводили в экспериментальном модуле Kibo японского аэрокосмического агентства, используя кристаллизационный бокс JBC [14].

На МКС в период полетов JAXA1-JAXA3 методом встречной диффузии были выращены кристаллы PRAT Mt и ее комплексов с функциональными лигандами, карбоксипептидазы T из КПТ wt, ее мутантной формы КПТ5 со встроенным центром первичной специфичности карбоксипептидазы B, тимидинфосфорилазы из *E. coli*, а также кристаллы комплексов этих белков.

В табл. 1 перечислены закристаллизованные белки и их комплексы с лигандами и приведены условия кристаллизации, при которых выросли кристаллы, использованные при получении дифракционных наборов. Фотографии ряда кристаллов представлены на рис. 4–7.

PRAT из *Mycobacterium tuberculosis* участвует в процессе биосинтеза кофермента А (CoA), катализируя предпоследнюю стадию синтеза – образование дефосфокофермента А (DPCoA) из 4'-фосфоантетеина и АТФ. Катализируемая PRAT реакция является ключевой, ее скорость регулируется конечным продуктом цикла – коферментом А. Последний, образуя комплекс с PRAT, ингибирует действие фермента. Поскольку кофермент А необходим для жизнедеятельности вызывающей туберкулез микобактерии, PRAT представляет удобную мишень для приготовления антитуберкулезных лекарств, особенно принимая во внимание, что в организмах млекопитающих биосинтез кофермента А осуществляется

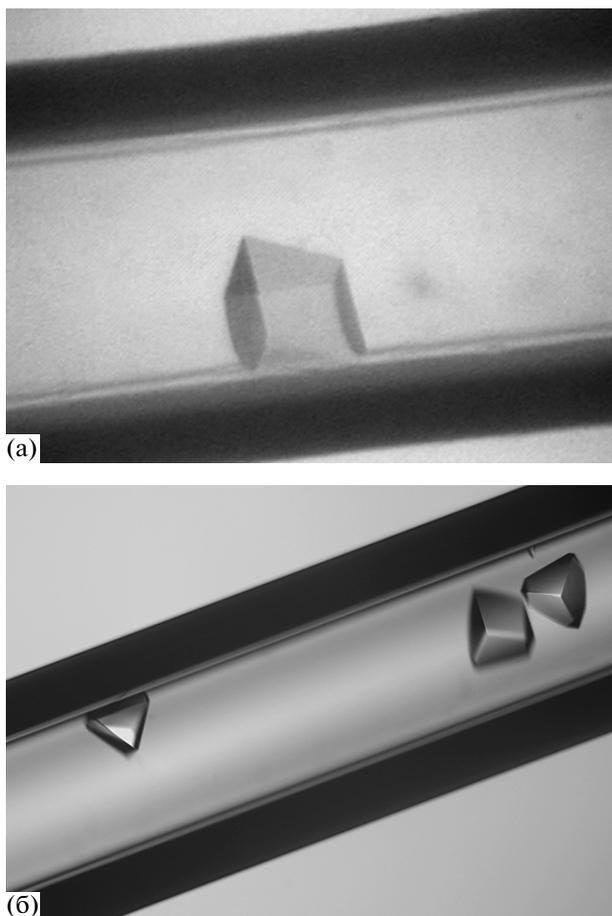


Рис. 5. Кристаллы РРАТ *Mt*: а – комплекса с СоА, б – комплекса с АТФ.

бифункциональным ферментом, отличным от бактериальных РРАТ. Наряду с кристаллами свободного фермента на МКС были получены кристаллы комплексов РРАТ с природным ингибитором коферментом А, с продуктом реакции – дефосфокоферментом А и с субстратом – АТФ.

АТФ является одним из субстратов катализируемой РРАТ-реакции. Комплекс РРАТ *Mt*/АТФ был выращен при использовании двух различных осадителей: сульфата аммония в одном случае и 2-метил-2,4-пентандиола (МПД) в присутствии гексамина кобальта в другом. Сравнение структур кристаллов, выращенных с разными осадителями, позволит определить, насколько ослабление водородных связей, вызванное присутствием органического растворителя (МПД), влияет на характер межмолекулярных связей в кристаллической решетке. Комплекс РРАТ/АТФ был закристаллизован в присутствии ионов магния, которые необходимы для протекания реакции.

Данные о строении комплекса РРАТ/СоА важны для понимания механизмов ингибирования фермента. СоА не принимает непосредственного участия в катализируемой РРАТ-реакции, но является природным ингибитором фермента. Когда

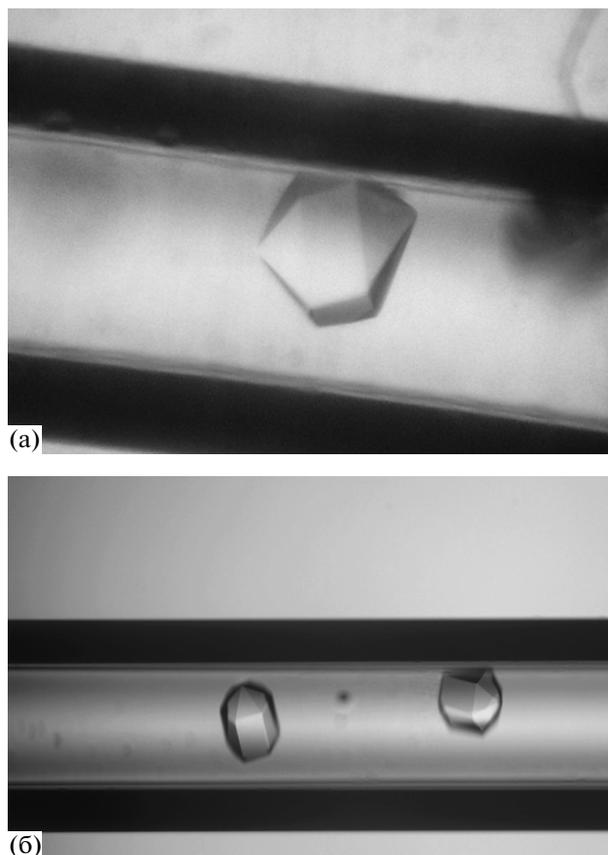


Рис. 6. Кристаллы карбоксипептидазы Т: а – КПТ wt, б – КПТ 5.

концентрация СоА повышается, он образует комплекс с РРАТ, тем самым прерывая процесс биосинтеза на предпоследней стадии.

Ранее при первоначальном поиске условий кристаллизации методом диффузии паров растворителя авторами были выращены кристаллы комплекса РРАТ *Mt*/СоА, с использованием которых пространственная структура была установлена при разрешении 2.1 Å [9]. Собранные в настоящей работе наборы дают возможность повысить разрешение данной структуры до 1.59 Å.

Установление пространственной структуры свободного РРАТ и его комплексов с субстратами и продуктами реакции позволит проследить конформационные изменения, сопровождающие ферментативную реакцию, что необходимо для понимания ее механизма. Кроме того, данные о пространственной структуре белка-мишени и его комплексов являются структурной основой для направленного поиска специфических ингибиторов фермента – потенциальных антитуберкулезных лекарств.

Рекомбинантная бактериальная карбоксипептидаза из *Thermoactinomyces vulgaris* (КПТ) представляет особый интерес как удобный объект для

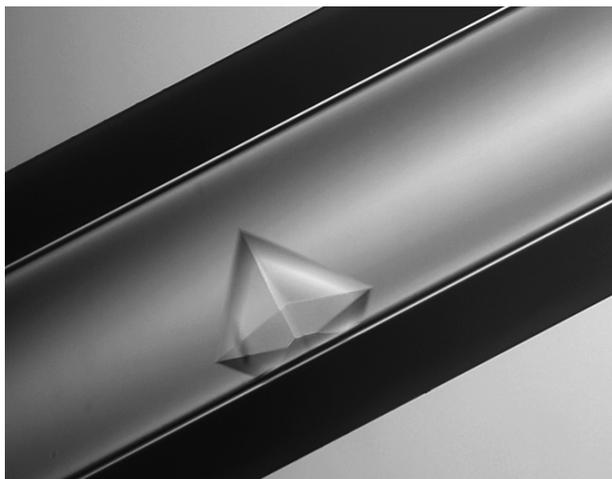


Рис. 7. Кристалл свободной тимидинфосфорилазы из *E. coli*.

изучения структурных основ специфичности этого семейства ферментов. Направленное изменение специфичности важно не только в теоретическом плане для понимания особенностей ферментативного катализа, но и является одной из актуальных задач инженерной энзимологии.

КПТ имеет строение активного центра, сходное с карбоксипептидазами А и В млекопитающих, но отличается от них более широкой специфичностью, отщепляя, хотя и с различной скоростью, С-концевые остатки положительно заряженных, отрицательно заряженных, а также гидрофобных аминокислот. Мутант КПТ5 содержит пять замен в субстрат-связывающем центре S1', что делает этот центр сходным по строению с S1'центром карбоксипептидазы В. Однако при исследовании свойств мутанта оказалось, что, несмотря на введенные замены, КПТ5 сохраняет специфичность карбоксипептидазы Т. Этот результат подтверждает предположение о том, что специфичность фермента зависит не только от природы аминокислотных остатков, непосредственно контактирующих с субстратом, но и от остатков, которые удалены от связанного субстрата.

Чтобы сравнить расположение боковых цепей аминокислотных остатков, связывающихся в S1'центре в обеих формах фермента, были выращены пригодные для структурного исследования кристаллы комплексов КПТwt и КПТ5 с производными лейцина и лизина (ВОС-L-Leu, Z-L-Lys).

Таблица 2. Характеристики выращенных в невесомости белковых кристаллов и собранных от них рентгенодифракционных наборов

Кристаллы белков	Разрешение, Å		Пространственная группа	Параметры ячейки, Å, град	Полнота набора, %	Rmerge (I), %	I/sigma
	наземн.	косм.					
PPAT	кристаллы отсутствуют	1.6	<i>H32</i>	$a = b = 98.67, c = 113.85, \alpha = \beta = 90.00, \gamma = 120.00$	91.0	4.4	48.538
PPAT/CoA	1.8	1.4	<i>H32</i>	$a = b = 98.88, c = 114.86, \alpha = \beta = 90.00, \gamma = 120.00$	98.2	4.8	58.095
PPAT/dpCoA	1.8	1.5	<i>H32</i>	$a = b = 99.22, c = 115.85, \alpha = \beta = 90.00, \gamma = 120.00$	98.8	4.9	53.602
PPAT/ATP	1.8	1.5	<i>H32</i>	$a = b = 99.75, c = 114.78, \alpha = \beta = 90.00, \gamma = 120.00$	95.5	6.6	35.159
PPAT/ATP + Mg	>5	1.81	<i>P321</i>	$a = b = 106.472, c = 71.323, \alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	91.1	6.7	15.786
КПТ5	1.4	1.09	<i>P6₃22</i>	$a = b = 158.101, c = 104.584, \alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	97.3	4.5	20.306
КПТ5/Z-L-Lys	1.9	1.4	<i>P6₃22</i>	$a = b = 158.243, c = 104.657, \alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	98.2	6.3	46.182
КПТ5/ВОС-L-Leu	1.7	1.4	<i>P6₃22</i>	$a = b = 157.866, c = 104.516, \alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	96.4	5.1	49.325
КПТ wt/Z-L-Lys	кристаллы отсутствуют	1.21	<i>P6₃22</i>	$a = b = 158.093, c = 104.072, \alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	98.5	10.6	12.602
КПТ wt/ВОС-L-Leu	кристаллы отсутствуют	1.12	<i>P6₃22</i>	$a = b = 157.914, c = 104.068, \alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	99.0	8.3	18.790
ТФ	>2	1.52	<i>P4₃2₁2</i>	$a = b = 129.951, c = 67.809, \alpha = \beta = \gamma = 90$	97.0	5.7	41.443
ТФ/ингибитор 1	>2	1.7	<i>P4₃2₁2</i>	$a = b = 129.691, c = 67.905, \alpha = \beta = \gamma = 90$	99.5	5.2	59.295
ТФ/ингибитор 2	кристаллы отсутствуют	1.85	<i>P4₃2₁2</i>	$a = b = 130.561, c = 68.160, \alpha = \beta = \gamma = 90$	99.9	14.1	14.892

Определение пространственной структуры КПТ и ее мутантных форм, содержащих замены в субстрат-связывающем центре и его окружении даст возможность выявить удаленные структурные детерминанты специфичности фермента. Выращенные ранее в наземных условиях кристаллы КПТ5 дифрагировали до разрешения 2.1 Å [11]. Выращенные в невесомости кристаллы КПТ5 дифрагировали до разрешения 1.09 Å.

ТФ катализирует катаболическую реакцию фосфоролиза пиримидиновых нуклеозидов в бактериальных клетках. ТФ используется при синтезе пуриновых и пиримидиновых дезокси-нуклеотидов, многие из которых являются лекарственными препаратами.

Тимидинфосфорилаза играет важную роль в клетке, будучи стимулятором роста новых кровеносных сосудов. Уровень этого фермента заметно повышен в клетках ряда опухолей. Поэтому в настоящее время ведется активный поиск специфических ингибиторов тимидинфосфорилазы и изучается их взаимодействие с ферментом. Кристаллы выращивали, модифицируя условия, приведенные в [17]. В данной работе наряду с кристаллами свободного белка выращены кристаллы комплексов ТФ с двумя ингибиторами — 3-амино-2-фтор-2,3-дидезокситимидином (ингибитор 1) и 3-амино-2,3-дидезокситимидином (ингибитор 2).

Как уже упоминалось, параллельно в тех же условиях и в том же оборудовании, которое применялось на МКС, были выращены кристаллы на Земле.

Морфологию наземных и космических кристаллов оценивали сначала визуально под микроскопом. По морфологии наземные и космические кристаллы в большинстве случаев не отличались друг от друга. Дифракционные наборы от космических и наилучших наземных кристаллов были собраны на синхротроне SPring 8 при температуре 100 К. Некоторые характеристики собранных дифракционных наборов представлены в табл. 2.

Все космические кристаллы дифрагировали до более высокого разрешения. В некоторых случаях, например, в случае комплекса тимидинфосфорилазы с 3-амино-2,3-дидезокситимидином, в наземных капиллярах кристаллы отсутствовали, а выросшие в невесомости кристаллы дифрагировали до 1.85 Å. Все наборы, собранные от космических кристаллов, имели лучшие характеристи-

ки, чем соответствующие наземные, и оказались пригодными для установления пространственной структуры соответствующих белков при высоком разрешении.

Работа выполнена при финансовой поддержке ЦНИИМаш Роскосмоса и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-04-01541).

Авторы выражают благодарность японским коллегам М. Sato, Н. Tanaka, К. Inaka и их сотрудникам за предоставленные консультации, заправку и сборку кристаллизационного бокса JCB, за помощь при получении дифракционных наборов на синхротроне SPring 8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McPherson A. // Cryst. Rev. 1996. V. 6. № 2. P. 157.
2. Куранова И.П. // Поверхность. Рентген., синхротрон. и нейтр. исслед. 2004. № 6. P. 6.
3. Chernov A.A. // Acta Cryst. A. 1998. V. 54. 859.
4. Otalora F., Novella M.I., Gavira J.A. et al. // Acta Cryst. D. 2001. V. 57. P. 412
5. Tanaka H., Umehara T., Inaka K. et al. // Acta Cryst. F. 2007. V. 63. P. 1.
6. Kundrot G.E., Juge R.A., Pussey M.L. et al. // Crystal Growth Des. V. 1. P. 87.
7. Smirnova E.A., Kislytsyn Y.A., Sosfenov N.I. et al. // Crystallography reports. 2009. V. 54. P. 901.
8. Timofeev V.I., Chuprov-Netochin R.N., Bezuglov V.V. et al. // Acta Cryst. 2010. V. F66. P. 5.
9. Timofeev V.I., Smirnova E.A., Chupova, L.A. et al. // Crystallography reports. 2010. V. 55. P. 1050.
10. Акпаров В.Х., Гришин А.М., Юсупова М.П. и др. // Биохимия. 2007. Т. 72. С. 515.
11. Акпаров В.Х., Гришин А.М., Timofeev V.I. et al. // Crystallography Reports. 2010. V. 55. P. 802.
12. Есинов Р.С., Гуревич А.И., Мирошников А.И., Чувиковский Д.В. Патент № 2188234.
13. Tanaka H., Inaka K., Sughiyama Sh. et al. // J. Synchrotron Rad. 2004. V. 11. P. 45.
14. Takahashi S., Tsurumura T., Aritake K. et al. // Acta Cryst. F. 2010. V. 66. P. 846.
15. Garcia-Ruiz J.M., Moreno A. // Acta Cryst. D. 1994. V. 50. P. 484.
16. Garcia Ruiz J.M., Gonzalez-Ramirez L.A., Gavira J.A. et al. // Acta Cryst. D. 2002. V. 58. P. 1638.
17. Cook W.J., Koszalka G.W., Hall W.W. et al. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 3788.