

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ РЕНТГЕНОВСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КРИСТАЛЛОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ СОКРИСТАЛЛИЗАЦИИ ГИПОКСАНТИН-ГУАНИНФОСФОРИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ *Escherichia coli* И ПРОИЗВОДНЫХ ПИРАЗИН-2-КАРБОКСАМИДА

© 2023 г. Ю. А. Абрамчик^{1,2,*}, Е. А. Заяц¹, В. И. Тимофеев^{2,3}, М. Б. Шевцов⁴, М. А. Костромина¹,
И. В. Фатеев¹, Д. О. Юровская¹, А. А. Каранов¹, И. Д. Константинова¹,
И. П. Куранова^{2,3}, Р. С. Есипов¹

¹Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

³Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

⁴Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

*E-mail: ugata@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.04.2023 г.

После доработки 24.04.2023 г.

Принята к публикации 22.05.2023 г.

Создан высокоэффективный штамм-продуцент *Escherichia coli* C3030/pET23d⁺-EcHGPRT, позволяющий получать рекомбинантную гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу из *E. coli* (EcHGPRT) в растворимой форме. Разработана методика выделения и очистки рекомбинантного белка. Определена удельная активность в отношении природного субстрата и производных пиразин-2-карбоксамида. Методом встречной диффузии в капилляре выращены кристаллы комплексов EcHGPRT с 3-гидроксипиразин-2-карбоксамидом (Т-1105) и с 6-фтор-3-гидроксипиразин-2-карбоксамидом (Т-705), пригодные для рентгеноструктурного исследования. Дифракционные наборы до разрешения соответственно 2.4 и 2.5 Å собраны на синхротроне ESRF (Франция, станция ID23-1) при температуре 100 К. Кристаллы относятся к пр. гр. P3(1)21, в независимой части ячейки содержатся две молекулы фермента.

DOI: 10.31857/S002347612360012X, EDN: ZZVSQF

ВВЕДЕНИЕ

Разработка и исследование механизма действия противовирусных препаратов – крайне актуальная задача, особенно в контексте пандемии COVID-19. Одним из классов соединений, представители которых проявляют активность против широкого круга вирусных инфекций, в том числе SARS-CoV-2, являются производные пиразин-2-карбоксамида. К данным соединениям относится 3-гидроксипиразин-2-карбоксамид (Т-1105), показавший активность против гриппа, вируса Эбола, желтой лихорадки и множества других инфекций [1–9]. Другим значимым соединением из этого класса является 6-фтор-3-гидроксипиразин-2-карбоксамид (Т-705), известный и широко применяемый в лечении COVID-19 под торговым наименованием фавипиравир [10–13].

Вещества Т-705 и Т-1105 представляют собой пролекарства – миметики пуринов, активация которых происходит в клетках человека посредством конверсии в нуклеотид при действии фер-

мента гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (HGPRT, КФ2.4.2.8) [14]. Природная функция HGPRT – фосфорилирование гипоксантина и гуанина с образованием инозин-5'-фосфата и гуанозин-5'-фосфата. При фосфорилировании веществ Т-705 и Т-1105 продуктами являются соответствующие мононуклеотиды – 6-фтор-3-гидроксипиразин-2-карбоксамид-рибоза-5'-монофосфат (Т-705-RMP) и 3-гидроксипиразин-2-карбоксамид-рибоза-5'-монофосфат (Т-1105-RMP). Эти нуклеотиды подвергаются фосфорилированию до ди- и трифосфатов, проявляющих противовирусную активность [14–16].

Данные о взаимодействии производных пиразин-2-карбоксамида с фосфорилирующей ферментативной активностью представляют интерес как для разработки новых противовирусных препаратов с повышенной эффективностью, так и для дизайна ферментов, предназначенных для синтеза фосфорилированных производных пиразин-2-карбоксамида. Пространственные структуры для HGPRT

установлены в [17–23]. Несмотря на это, единственная известная структура HGPRT в комплексе с производным пиразин-2-карбоксамидов — это фермент человека в комплексе с продуктом-нуклеотидом T-705-RMP (PDB 4KN6), в то время как структуры HGPRT со свободными азотистыми основаниями данного класса соединений отсутствуют [14].

В настоящей работе представлены результаты предварительного рентгеновского исследования кристаллов, полученных при сокристаллизации *EcHGPRT* и двух противовирусных производных пиразин-2-карбоксамидов: веществ T-705 и T-1105. *EcHGPRT* — один из перспективных кандидатов для использования в биотехнологических процессах. Аминокислотные последовательности *EcHGPRT* и HGPRT человека идентичны на 33%. Пространственная структура *EcHGPRT* известна как для свободного фермента, так и для комплексов фермента с инозином и гуанозином [19]. В настоящей работе описано получение рекомбинантного препарата *EcHGPRT*, получение кристаллов комплексов *EcHGPRT* с соединениями T-705 и T-1105 и их предварительное рентгеновское исследование.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание штамма-продуцента. Ген *hpt* (Genbank ID AIF91732) амплифицировали на матрице геномной ДНК *E. coli* и клонировали в вектор pET23a+ по сайтам узнавания рестриктаз NcoI и XhoI. Созданный экспрессионный вектор содержал ген, кодирующий *EcHGPRT* с С-концевым 6xHis-tag. Создан штамм-продуцент *E. coli* C3030/pET23d⁺-*EcHGPRT*, при культивировании которого целевой фермент синтезируется преимущественно в растворимой форме.

Выделение и очистка *EcHGPRT* включали в себя следующие стадии: разрушение клеточной биомассы в буферном растворе 20 mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, металл-хелатную аффинную хроматографию на сорбенте Protino Ni-NTA (Macherey-Nagel) с элюцией в ступенчатом градиенте 500 mM имидазола, концентрирование на ультрафильтрационной мембране из регенерированной целлюлозы Ultracel 30 кДа (PLTK06210, Millipore) до концентрации 10 мг/мл, гель-фильтрационную хроматографию на колонке HiLoad 16/60 Superdex 75 (GE Healthcare) в буферном растворе, содержащем 50 mM Трис-НCl, pH 7.4, 10 mM MgCl, 5% глицерина, 0.04% NaN₃, концентрирование до 17 мг/мл.

Определение удельной активности. Активность *EcHGPRT* в отношении гипоксантина и производных пиразин-2-карбоксамидов исследовали посредством детекции (обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография,

ОФ ВЭЖХ) конверсии азотистого основания в нуклеотид. Состав реакционной смеси: 0.5 mM исследуемого азотистого основания, 0.5 mM 5-фосфорибозил- α -1-пирофосфата (PRPP), 1 mM MgCl₂, 20 mM Трис-НCl, pH 8.0. Инкубацию проводили в течение 2 мин при 10–70°C для смесей с гипоксантином и при 44°C — с T-705 и T-1105. Концентрации субстратов и продуктов определяли при помощи ОФ ВЭЖХ в изократическом методе элюирования 0.1%-ным водным раствором трифторуксусной кислоты на системах Waters с колонкой Nova-Pak C18, 4 мкм, 150 × 4.6 мм, скорость потока 1 мл/мин, УФ-детектирование при 254 нм в случае гипоксантина и 350 нм — для веществ T-705 и T-1105 (детектор Waters 2489).

Кристаллизация. Для получения кристаллов *EcHGPRT* к 2 мкл раствора белка в 50 mM Трис-НCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 5% глицерина, 0.04% NaN₃, с концентрацией белка 17 мг/мл добавляли равный объем раствора осадителя. В качестве осадителя использовали раствор, содержащий 0.15 М цитрата натрия, 0.1 М HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), pH 6.8. Каплю раствора помещали на поверхность силиконированной стеклянной пластинки, которой накрывали кювету, содержащую 1 мл раствора осадителя. Кристаллы появлялись в течение двух недель. Для улучшения качества кристаллов условия кристаллизации *EcHGPRT* адаптированы и оптимизированы применительно к методу встречной диффузии в капилляре [24]. Для получения комплексов *EcHGPRT* с T-705 и T-1105 методом встречной диффузии в капилляре к 7 мкл раствора белка в 50 mM Трис-НCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 5% глицерина, 0.04% NaN₃, с концентрацией белка 17 мг/мл добавляли соответствующие лиганды до концентрации 5 mM. В качестве осадителя использовали раствор, содержащий 0.15 М цитрата натрия, 0.1 М HEPES, pH 6.8. Кристаллы появлялись в течение двух недель.

Рентгеновское исследование кристаллов. Получение и обработка дифракционных наборов. Дифракционные наборы для T-705 и T-1105 до разрешения соответственно 2.4 и 2.5 Å собраны на синхротроне ESRF (Франция, станция ID23-1) при температуре 100 К. В качестве детектора использовали Pilatus6MF. Дифракционные данные получали от одного кристалла методом вращения-качания при расстоянии между кристаллом и детектором 400 мм и длине волны 0.96772 Å; углы качания и вращения — 0.1° и 360° соответственно. Для регистрации отражений использовали детектор прямого действия — Pilatus6MF. Обработку набора экспериментальных интенсивностей отражений проводили с помощью программы iMosflm [25]. Статистические характеристики дифракционных данных приведены в табл. 1. Кристаллы относятся к пр. гр. P3(1)21. В незави-

Таблица 1. Статистические характеристики дифракционных наборов

Статистические характеристики	<i>Ec</i> HGPRT с T-1105	<i>Ec</i> HGPRT с T-705
Пр. гр.	<i>P</i> 3(1)21	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , Å; α, β, γ, град	84.65, 54.65, 167.24; 90, 90, 120	83.92, 167.02; 90, 90, 120
Разрешение, Å	2.40	2.55
Количество независимых рефлексов	27430	23319
Полнота набора, %	98.81	98.43
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	2.97	2.85
<i>R</i> _{merge} -F, %	23.5	19.1

симой части ячейки содержатся две молекулы фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Провели клонирование гена, кодирующего *Ec*HGPRT, создали высокоэффективный штамм-продуцент, подобрали условия культивирования и разработали методику выделения и очистки фермента, включающую в себя две хроматографические стадии. Всего было наработано 78.5 мг *Ec*HGPRT с концентрацией 17 мг/мл и чистотой 98.6%.

Для полученного препарата *Ec*HGPRT выявлена активность в отношении природного субстрата, определен температурный оптимум и исследована активность в отношении веществ T-705 и T-1105.

Как видно на рис. 1а, температурный оптимум *Ec*HGPRT – 44°C, при этой температуре активность фермента в отношении природного субстрата гипоксантина составила 290 мкМ/(мин·мг). В условиях температурного оптимума удалось

подтвердить активность *Ec*HGPRT в отношении противовирусных веществ T-705 и T-1105 (рис. 1б). При этом активность фермента в отношении обоих неприродных субстратов оказалась на порядки ниже по сравнению с гипоксантином. Активность *Ec*HGPRT в отношении вещества T-1105 в 2 раза выше по сравнению с его фторированным производным T-705. Таким образом, подтвердили, что *Ec*HGPRT обладает сродством к производным пиразин-2-карбоксамида и что для этого фермента характерна субстратная специфичность, схожая с HGPRT человека [14].

Исследование пространственной структуры комплексов *Ec*HGPRT с T-1105 и T-705 может показать, какие аминокислотные остатки принимают участие в связывании этих соединений и играют определяющую роль в субстратной специфичности фермента. При подборе условий кристаллизации рекомбинантной *Ec*HGPRT с лигандами за основу были взяты условия кристаллизации гипоксантинфосфорибозил трансферазы *E. coli* (pdb ID 1GRV). Согласно [26] у 6-фторпроизводных пиразин-2-карбоксамида,

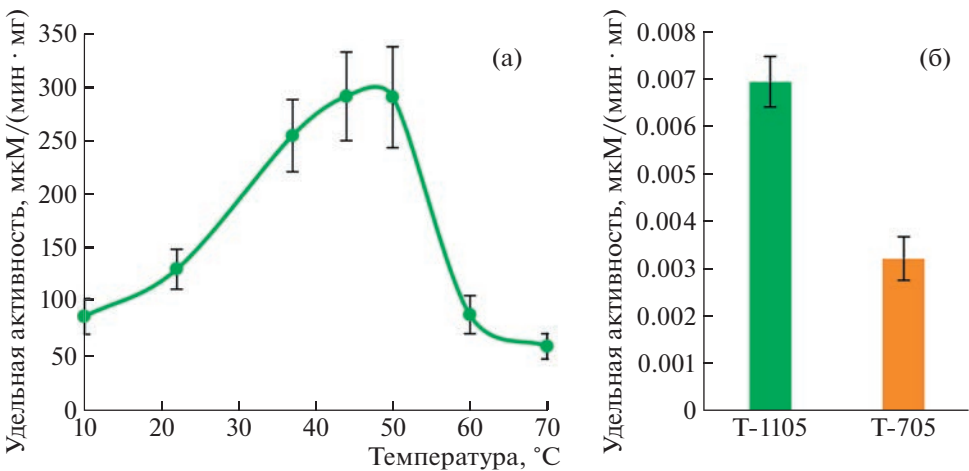


Рис. 1. Удельная активность *Ec*HGPRT в отношении природных и неприродных субстратов: а – температурная зависимость активности в отношении гипоксантина, б – активность в отношении производных пиразин-2-карбоксамида. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения.

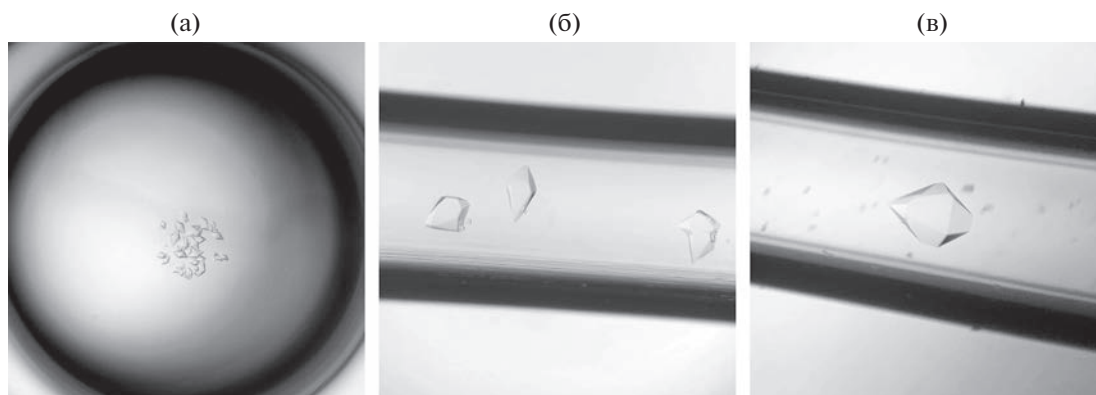


Рис. 2. Кристаллы *EeHGPRT*, полученные методом диффузии паров осадителя в висячей капле (а), методом встречной диффузии в капилляре при сокристаллизации с веществом Т-705 (б), методом встречной диффузии в капилляре при сокристаллизации с веществом Т-1105 (в).

Т-705 и Т-705-RMP при $\text{pH} > 7$ происходит гидролиз гетероциклического основания. В связи с этим условия кристаллизации были скорректированы изменением значения pH с 7.5 до 6.8. При выращивании кристаллов методом диффузии паров растворителя в висячей капле не удалось получить монокристаллы, пригодные для рентгеновского исследования, из-за образования сростков кристаллов (рис. 2а). При адаптации условий кристаллизации применительно к методу встречной диффузии в капилляре удалось решить проблему образования друз и увеличить размер монокристаллов на порядок. Кристаллы относятся к пр. гр. $P3(1)21$. В независимой части ячейки содержатся две молекулы фермента. С кристаллов, полученных сокристаллизацией с Т-705 и Т-1105, собраны дифракционные наборы (рис. 2б, 2в). Дифракционные наборы комплексов *EeHGPRT* с Т-1105 и Т-705 собраны до разрешения 2.4 и 2.55 Å соответственно.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-13-00429) в части получения и исследования кинетических параметров рекомбинантного фермента, а также при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части кристаллизации и сбора дифракционных данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hucke F.I.L., Bestehorn-Willmann M., Bassetto M. et al.* // *Virus Genes*. 2022. V. 58 (3). P. 188. <https://doi.org/10.1007/s11262-022-01892-x>
2. *De Vleeschauwer A.R., Lefebvre D.J., Willems T. et al.* // *Transbound. Emerg. Dis*. 2016. V. 63 (2). P. e205. <https://doi.org/10.1111/tbed.12255>
3. *Hayden F.G., Shindo N.* // *Curr. Opin. Infect. Dis*. 2019. V. 32 (2). P. 176. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000532>
4. *Delang L., Abdelnabi R., Neyts J.* // *Antiviral Res*. 2018. V. 153. P. 85. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.03.003>
5. *De Clercq E., Li G.* // *Clin. Microbiol. Rev*. 2016. V. 29 (3). P. 695. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15>
6. *Furuta Y., Takahashi K., Shiraki K. et al.* // *Antiviral Res*. 2009. V. 82 (3). P. 95. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.02.198>
7. *Furuta Y., Komeno T., Nakamura T.* // *Proc. Jpn. Acad. B. Phys. Biol. Sci*. 2017. V. 93 (7). P. 449. <https://doi.org/10.2183/pjab.93.027>
8. *Lu J.W., Chen Y.C., Huang C.K. et al.* // *Antiviral Res*. 2021. V. 195 P. 105188. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105188>
9. *Furuta Y., Takahashi K., Fukuda Y. et al.* // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2002. V. 46 (4). P. 977. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.4.977-981.2002>
10. *Konstantinova I.D., Andronova V.L., Fateev I.V., Esipov R.S.* // *Acta Naturae*. 2022. V. 14 (2). P. 16. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11652>
11. *Negru P.A., Radu A.F., Vesa C.M. et al.* // *Biomed. Pharmacother*. 2022. V. 147. P. 112700. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112700>
12. *Hung D.T., Ghula S., Aziz J.M.A. et al.* // *Int. J. Infect. Dis*. 2022. V. 120. P. 217. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.04.035>
13. *Garcia-Lledo A., Gomez-Pavon J., Gonzalez Del Castillo J. et al.* // *Rev. Esp. Quimioter*. 2022. V. 35 (2). P. 115. <https://doi.org/10.37201/req/158.2021>
14. *Naesens L., Guddat L.W., Keough D.T. et al.* // *Mol. Pharmacol*. 2013. V. 84 (4). P. 615. <https://doi.org/10.1124/mol.113.087247>
15. *Sangawa H., Komeno T., Nishikawa H. et al.* // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2013. V. 57 (11). P. 5202. <https://doi.org/10.1128/AAC.00649-13>

16. *Shannon A., Selisko B., Le N.T. et al.* // Nat. Commun. 2020. V. 11 (1). P. 4682.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-18463-z>
17. *Eads J.C., Scapin G., Xu Y. et al.* // Cell. 1994. V. 78 (2). P. 325.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90301-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90301-8)
18. *Schumacher M.A., Carter D., Roos D.S. et al.* // Nat. Struct. Biol. 1996. V. 3 (10). P. 881.
<https://doi.org/10.1038/nsb1096-881>
19. *Guddat L.W., Vos S., Martin J.L. et al.* // Protein Sci. 2002. V. 11 (7). P. 1626.
<https://doi.org/10.1110/ps.0201002>
20. *Shi W., Li C.M., Tyler P.C. et al.* // Biochemistry. 1999. V. 38 (31). P. 9872.
<https://doi.org/10.1021/bi990664p>
21. *Focia P.J., Craig 3rd S.P., Nieves-Alicea R. et al.* // Biochemistry. 1998. V. 37 (43). P. 15066.
<https://doi.org/10.1021/bi981052s>
22. *Shi W., Munagala N.R., Wang C.C. et al.* // Biochemistry. 2000. V. 39 (23). P. 6781.
<https://doi.org/10.1021/bi000128t>
23. *Monzani P.S., Trapani S., Thiemann O.H., Oliva G.* // BMC Struct. Biol. 2007. V. 7 (59).
<https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-59>
24. *Takahashi S., Tsurumura T., Aritake K. et al.* // Acta Cryst. F. 2010. V. 66 (7). P. 846.
<https://doi.org/10.1107/S1744309110020828>
25. *Battye T.G., Kontogiannis L., Johnson O. et al.* // Acta Cryst. D. 2011. V. 67 (4). P. 271.
<https://doi.org/10.1107/S0907444910048675>
26. *Huchting J., Winkler M., Nasser H., Meier C.* // ChemMedChem. 2017. V. 12 (9). P. 652.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201700116>