



НОВЫЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БЕЛКОВ С НЕИЗВЕСТНЫМИ ФУНКЦИЯМИ

© 2012 г. М. А. Горбачева^{*,***}, А. Г. Ярош^{*}, П. В. Дороватовский^{*},
Т. В. Ракитина^{*,***}, К. М. Бойко^{*,**}, Д. А. Корженевский^{*}, А. В. Липкин^{*},
В. О. Попов^{**}, И. А. Шумилин^{****}

^{*} НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123182, пл. академика Курчатова, 1

^{**} Учреждение РАН Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва

^{***} Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997,
ул. Миклухо-Маклая, 16/10

^{****} Виргинский университет, г. Шарлоттсвилл, Виргиния, США

Поступила в редакцию 20.06.2011 г. Принята к печати 12.07.2011 г.

В бактериальной системе *Escherichia coli* осуществлена продукция трех белков из экстремофильных бактерий: гипотетической монооксигеназы из *Deinococcus radiodurans*, гипотетической нуклеотидил-трансферазы из *Thermotoga maritime* и гипотетической оксидоредуктазы из *Exiguobacterium sibiricum*, а также белка-шаперона из *Homo sapiens* DJ-1. Подобраны условия выделения и очистки рекомбинантных белков, позволяющие получать целевые продукты экспрессии с чистотой не менее 96%. Определены условия кристаллизации, обеспечивающие стабильный рост кристаллов. Проведены рентгеноструктурные эксперименты с целью проверки качества кристаллов; разрешение полученных структурных данных составляло от 1.2 до 1.8 Å.

Ключевые слова: неизвестный лиганд, кристаллизация, рентгеноструктурный анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Белки с еще не установленными функциями составляют 30–40% от общего количества белков, закодированных в любом известном на сегодняшний день бактериальном геноме; их доля даже выше в случае эукариотических геномов, включая геном человека [1–3]. За последнее десятилетие, когда каждый год определяются сиквенсы десятков геномов и сотни новых пространственных структур белковых молекул, все более критичным становится отставание функциональных исследований [4]. В результате чего классический путь научного исследования белков: функция – белок/ген – пространственная структура белка, приобретает постгеномный подход: ген/белок – пространственная структура белка – функция [5, 6].

В настоящее время можно выделить два основных подхода к определению функций белков. В основе первого лежит тот факт, что гомологичные белки обычно имеют сходные пространственные

структуры и часто выполняют в клетке аналогичные функции, которые могут быть предсказаны на основании структурного анализа [7–9]. Вторым подходом основан на постулате о необходимости координированной экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие в одном и том же метаболическом пути, и использует данные сравнительной геномики, изучающей относительное расположение генов в геноме, частоту их слияния друг с другом и профили экспрессии [10–12].

Следует отметить, что немаловажный вклад в изучение неизвестной белковой функции может внести определение биологического лиганда – низкомолекулярного соединения, способного специфически связываться с молекулой белка. Примером успешного использования данного подхода является работа по исследованию ядерных рецепторов с неизвестными функциями с помощью метода химических зондов [13].

Анализ пространственных структур белков, представленных в базе данных Protein Data Bank (PDB, <http://www.pdb.org>), показывает, что достаточно большое количество молекул, включая малоизученные белки, сохраняют связь со своими биологическими лигандами (тоже порой неидент-

Сокращения: PCA – рентгеноструктурный анализ, MPD – 2-метил-2,4-пентадиол, ПЭГ – полиэтиленгликоль.

Автор для связи (+7 (906) 695-53-60; эл. почта: gorbacheva-marina@yandex.ru).

Таблица 1. Характеристика белков – объектов исследования

Название белка	GI, ID клона ¹	Организм – хозяин	Расчетная молекулярная масса, кДа	Предполагаемая функция	Литературные источники
Dr_2100	15807094, DrCD00085707	<i>Deinococcus radiodurans</i>	12.7	Моноксигеназа, участвующая в биосинтезе антибиотиков	[14]
Tm_1012	15643770, TmCD00084734	<i>Thermotoga maritima</i>	20.5	Нуклеотидилтрансфераза	[16]
Exig_1997	150261587, EsCD00092207	<i>Exiguobacterium sibiricum</i> 255-15	19.1	Оксидоредуктаза	[14]
DJ-1	34193707 HsCD00288489	<i>Homo sapiens</i>	20.7	Шаперон, ассоциирован с болезнью Паркинсона	[17]

¹ Идентификационный номер клона в DNASU plasmid repository (<http://dnasu.asu.edu/DNASU>).

тифицированными) даже после многоступенчатого процесса выделения и очистки белка, предшествующего постановке кристаллизации [14]. Определение химической природы таких лигандов может значительно приблизить нас к пониманию неизвестной функциональной роли белкамишени в клетке, а также, при необходимости, может служить основой для исследований, направленных на разработку низкомолекулярных химических ингибиторов исследуемого белка.

Для изучения неизвестных биологических лигандов могут быть использованы различные подходы. В работе [15] предложено проводить поиск соединений, способных связываться с белкоммишенью, с помощью методов дифференциальной сканирующей калориметрии или дифференциальной сканирующей флуориметрии, позволяющих осуществлять скрининг коллекций лигандов, содержащих значительное ($10-10^3$) число соединений разных классов. Предлагаемая нами альтернативная стратегия предполагает выделение низкомолекулярных лигандов из препаратов белков и определение химической природы лигандов с помощью масс-спектрометрии. Впоследствии, найденное взаимодействие должно быть подтверждено другими методами, например, в кристаллизационном эксперименте, проводимом в формате сокристаллизации комплекса белок-лиганд или методом настаивания уже полученных кристаллов белков в растворах, содержащих потенциальные лиганды. Таким образом, необходимым этапом работы по определению неизвестных лигандов является получение кристаллов белков-мишеней, пригодных для РСА.

Цель данного исследования состояла в наработке, выделении и очистке рекомбинантных белков, а также в подборе условий кристаллизации и проверке качества полученных кристаллов. В качестве объектов исследования были выбраны белки с неустановленными функциями, способные связывать неизвестные лиганды, а также

один белок, являющийся перспективной фармакологической мишенью.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве объектов исследования была выбрана группа из четырех белков, основная информация о которых представлена в табл. 1. В группу вошли три белка из экстремофильных бактерий: радиоустойчивой *Deinococcus radiodurans*, термофильной *Thermotoga maritima* и холодоустойчивой *Exiguobacterium sibiricum*, отнесенные к перечисленным в таблице белковым семействам на основании незначительной (<40%) гомологии аминокислотных последовательностей. Анализ пространственных структур этих белков, представленных в базе данных PDB, показал, что они способны связывать неидентифицированные органические молекулы [14]. Четвертый белок представлял собой активно изучаемый в настоящее время шаперон человека (*Homo sapiens*), ассоциированный с болезнью Паркинсона и участвующий в регуляции клеточного ответа на окислительный стресс [17]. Клоны, содержащие плазмиды с кДНК используемых в работе белков, были получены из американского репозитория плазмид Университета Штата Аризоны (табл. 1). Для наработки белков использовали бактериальную систему экспрессии *E. coli*.

Все исследуемые белки в *N*-концевых областях содержали последовательности из шести гистидиновых остатков, что позволяло проводить выделение с помощью высокоэффективной металлохелатной аффинной хроматографии на Ni^{2+} -сефарозе. В трех белках: Dr_2100, Exig_1997 и DJ-1, шесть *N*-концевых гистидиновых остатков были отделены от последовательностей, кодирующих целевые белки, участками узнавания-расщепления TEV-протеиназы – высокоспецифичной протеиназы из вируса гравировки табака [18], что позволяло получать целевой белковый продукт, не содержащий лишних аминокислотных остатков.

В дополнение к металлохелатной хроматографии, для увеличения степени очистки белка, что особенно важно для кристаллизации, использовали гельфильтрационную хроматографию, во время которой белки переводили в буфер, содержащий небольшие количества 2-меркаптоэтанола и EDTA, что должно было способствовать повышению стабильности белка в процессе хранения и кристаллизации.

Выделенные белки анализировали с помощью электрофореза в 12.5% ПААГ в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием Кумасси G-250 (рис. 1). Все белки обладали электрофоретическими подвижностями, соответствующими расчетным молекулярным массам, и имели чистоту не менее 96% (табл. 2). Концентрацию очищенных белков определяли по методу Бредфорд. В качестве стандарта использовали растворы бычьего сывороточного альбумина известной концентрации (Sigma, США). Выходы рекомбинантных белков составляли от 12 до 60 мг белка из 5 л клеток *E. coli* (табл. 2). Выделенные белки сразу использовали в кристаллизационном эксперименте либо разделяли на аликвоты, которые после заморозки в жидком азоте хранили на -70°C .

Первичный скрининг условий кристаллизации проводили с использованием растворов для кристаллизации компании Hampton Research и роботизированной системы кристаллизации Rigaku (Япония), позволяющей работать с микрообъемами растворов, начиная с 0.1 мкл, что существенно экономило и белок и коммерческие ресурсы. В результате первичного скрининга были найдены условия кристаллизации для всех исследуемых белков, которые затем использовали как отправные точки для оптимизации.

Оптимизацию проводили в ручном режиме методом диффузии в парах (висячая капля). Индивидуально для каждого белка подбирали оптимальную концентрацию осадителя, выбранного в результате скрининга, а также уточняли опти-

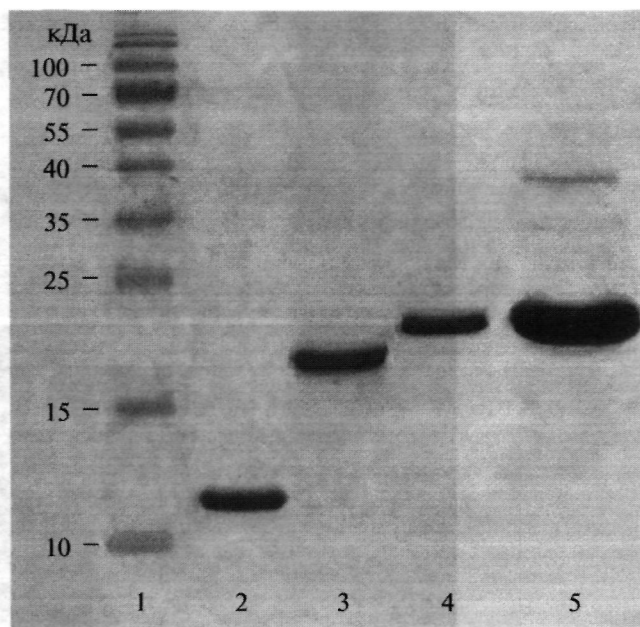


Рис. 1. Электрофореграмма очищенных рекомбинантных белков Dr_2100 (2), Exig_1997 (3), Tm_1012 (4), DJ-1 (5), выделенных из клеток *E. coli*, в 12.5% SDS-ПААГ, окраска Кумасси R-250. Дорожка 1 – маркер молекулярных масс Fermentas “Page Ruler” (10–170 кДа).

мальное значение pH, что позволило найти условия, в которых происходил стабильный рост кристаллов (табл. 2). На рис. 2 представлены фотографии кристаллов, отобранных для рентгеноструктурного эксперимента, проводимого с целью определения качества полученных кристаллов.

Следует отметить, что в условиях проведения рентгеноструктурного эксперимента с целью защиты кристаллов от разрушения при глубокой заморозке (температура -173°C), используют специальные вещества – криопротектанты, препятствующие образованию льда в кристалле. Как следует из табл. 2, только кристаллы белка

Таблица 2. Результаты выделения и очистки, а также условия кристаллизации исследуемых белков

Белок	Выход из 5 л культуры и чистота белка, мг/%	Концентрация препарата, используемого для кристаллизации, мг/мл	Условия кристаллизации, отобранные в результате оптимизации	Время роста кристаллов, сут
Dr_2100	13/99	15	0.1 М ацетат натрия pH 4.6, 2 М сульфат аммония	5
Tm_1012	50/99	16	0.1 М ацетат натрия pH 4.6, 0.2 М хлорид натрия, 30% v/v МПД	3
Exig_1997	60/99.8	17	0.1 М бичин pH 9.0, 22% w/v ПЭГ 8000	7
DJ-1	25/96	30	0.03 М лимонная кислота, 0.07 М бис-трис-пропан, pH 7.6, 20% w/v ПЭГ 3350	14

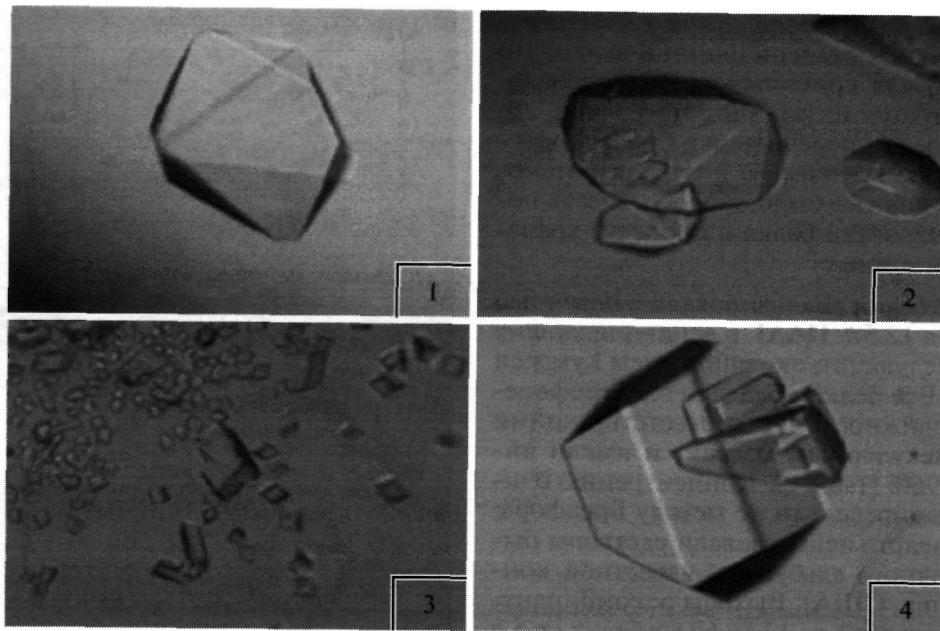


Рис. 2. Фотографии выращенных кристаллов белков DJ-1 (1), Dr_2100 (2), Exig_1997 (3), Tm_1012 (4), полученные с помощью микроскопа Nikon eclipse 50i, снабженного камерой Nikon DS-Fi1.

Tm_1012 были выращены в кристаллизационном растворе, содержащем в своем составе криопротектант — MPD. Кристаллы трех остальных исследуемых белков непосредственно перед съемкой помещали на 1–3 с в раствор, содержащий помимо всех компонентов кристаллизационного раствора 25% (по объему) глицерина.

Рентгеноструктурный эксперимент проводили с использованием синхротронного источника рентгеновского излучения как описано в разделе “Экспериментальная часть”. Полученные дифракционные данные были обработаны с использованием программного комплекса XDS [19]. Результаты обработки представлены в табл. 3. Разрешение всех полученных структурных данных было достаточ-

но высоким от 1.2 до 1.8 Å. Решение структур проводили при помощи программы BALBES [20], кристаллографическое уточнение — при помощи программного комплекса CCP4 [21], а уточнение, включающее добавление молекул растворителя и анализ альтернативных положений боковых цепей, — в ручном режиме при помощи программы COOT [22].

Следует отметить, что два белка Exig_1997 и DJ-1 закристаллизовались в пространственных группах, аналогичных ранее депонированным в банк данных RCSB (<http://www.rcsb.org>) структурам 2Q9K и 1P5F, соответственно. Для двух других белков Dr_2100 и Tm_1012 были получены более высокосимметричные пространственные

Таблица 3. Анализ дифракционных данных

Белок	Разрешение, Å	Пространственная группа	Параметры ячейки, Å	R_f/R_{free} , %	Полнота (в последнем шелле), %
Dr_2100	1.47	P61	$a = b = c = 69.92$; $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$	15.3/17.7	99.6 (98.8)
Tm_1012	1.20	C121	$a = 63.76$; $b = 53.46$; $c = 53.75$; $\alpha = \gamma = 90^\circ$; $\beta = 104.9^\circ$	16.1/18.1	93.7 (87.3)
Exig_1997	1.80	P3121	$a = b = 55.26$; $c = 95.43$; $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$	24.5/28.6	96.6 (84.1)
DJ-1	1.55	P3121	$a = b = 74.37$; $c = 74.4$; $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$	14.5/17.1	96.1 (84.2)

R_f — кристаллографический R-фактор.

R_{free} — R-фактор, рассчитанный по пяти процентам случайно выбранных отражений, которые не приняли участия в уточнении структуры.

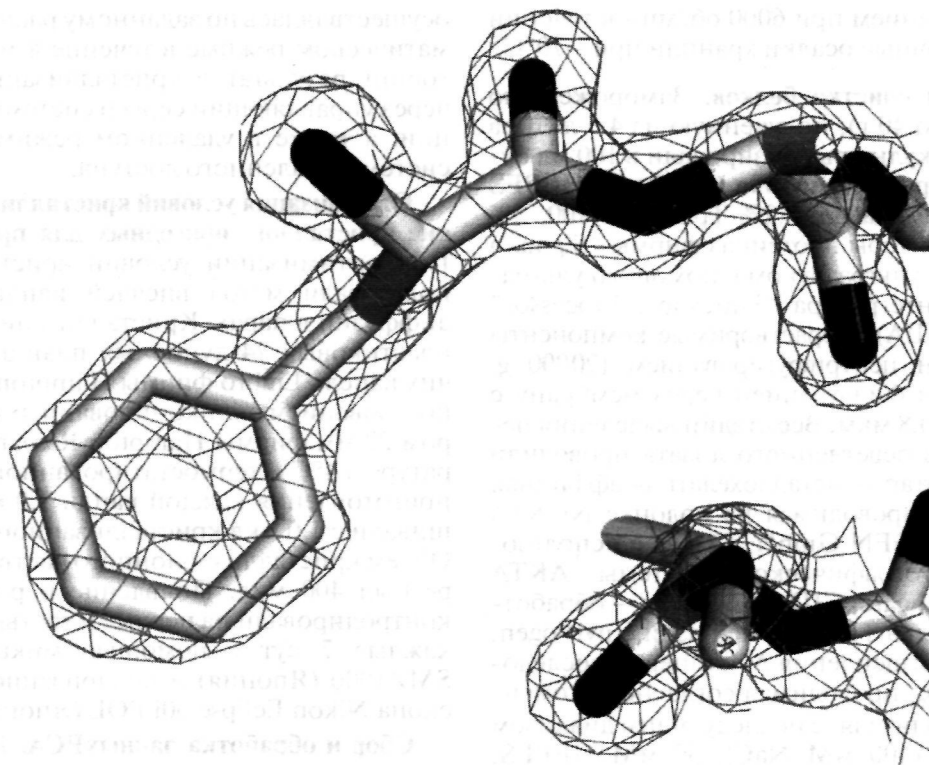


Рис. 3. Качество карты электронной плотности в структуре белка Tm_1012. Карта 2Fo-Fc. Уровень срезки – 1σ. Показана боковая цепь остатка фенилаланина 117.

группы, чем в структурах 3E8O и 2FCL, ранее депонированных в банк данных RCSB, что подразумевает иную пространственную укладку молекул белка в кристалле. Уточнение ряда структур и их анализ в настоящее время еще не закончен, но можно отметить, что достигнутое разрешение и качество карт электронной плотности (рис. 3) позволит проводить детальное исследование как самих белков, так и комплексов белок-лиганд.

Заключение. В результате проведенных экспериментов по скринингу и оптимизации условий кристаллизации были подобраны условия, в которых наблюдался стабильный рост кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа на синхротронном источнике и подходящих для решения и уточнения пространственных структур.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клонирование и продукция белков в *E. coli*. Для продукции белков Dg_2100, Exig_1997 и Tm_1012 использовали плазмиды, выделенные из клонов, полученных из американского репозитория плазмид Университета Штата Аризона (табл.1). В случае белков Dg_2100 и Exig_1997 индукция гена T7-РНК-полимеразы обеспечивала экспрессию белков, слитых на N-конце с последовательностями MGSDKINNNNN ENLYFQG. Для экс-

прессии белка Tm_1012, слитого на N-конце с шестью гистидиновыми остатками, использовали индукцию арабинозой (Sigma, США). Клон, продуцирующий белок DJ-1, был любезно предоставлен С.В. Шумиловой (Виргинский университет, США).

Культивирование клеток *E. coli* K-12 штамм BL21(DE3), трансформированных целевыми плазмидами, проводили в низкосолевого среде LB (RPI, США), содержащей ампициллин (Merck, США) в концентрации 100 мкг/мл (Tm_1012 и DJ-1) или канамицин (Merck, США) в концентрации 50 мкг/мл (Dg_2100 и Exig_1997) и противопенный реагент. Ночную культуру объемом 10 мл с посевным материалом стерильно переносили в предварительно подготовленный ферментер RALF PLUS (Bioengineering, Швейцария), содержащий 4.5 литра среды. Параметры культивирования: температура среды $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$, pH 7.0 ± 0.1 , аэрация 30 л/ч, частота оборотов мешалки 600 об/мин. Контроль плотности клеток в культуре осуществляли методом выносной пробы при помощи спектрофотометра SmartSpectPlus (BioRad, США) в режиме A_{600} OD 600. По достижении оптического поглощения величины 0.6–0.7 клетки индуцировали IPTG (0.2 мМ), а в случае Tm1012 – арабинозой (0.5%) в течении 20 ч при температуре $17 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Затем клетки осаждали

центрифугированием при 6000 об/мин в течение 20 минут. Клеточные осадки хранили при -70°C .

Выделение и очистка белков. Замороженную биомассу (около 40 г), полученную из 4.5 литров бактериальной культуры, лизировали в 100 мл буферного раствора (400 мМ NaCl, 50 мМ HEPES pH 7.4, 5 мМ имидазол, 0.2% Тритон X-100, 5% глицерола, ингибиторы протеиназ фирмы "Sigma") и обрабатывали ультразвуком с помощью ультразвукового дезинтегратора "Ultrasonic Processor" (Cole Parmer, США). Нерастворимые компоненты лизата осаждали центрифугированием (20000 g, 15 мин, $+4^{\circ}\text{C}$) и фильтрацией через мембрану с диаметром пор 0.8 мкм. Все стадии выделения целевого белка из осветленного лизата проводили при $+4^{\circ}\text{C}$: 1-й этап – металлохелатная аффинная хроматография, проводимая на колонке Ni-NTA Superflow (QUIAGEN GmbH, США) с использованием хроматографической системы АКТА Prime (GE Healthcare, США); 2-й этап – обработка препарата белка TEV-протеиназой (Invitrogen, США) с целью отщепления N-концевой последовательности His₆, проводимая согласно рекомендациям производителя, с последующим диализом против буфера (400 мМ NaCl, 50 мМ HEPES, pH 7.4, 5 мМ имидазол) и освобождением от His₆-тага и препарата протеиназы на колонке с Ni²⁺-сефарозой; 3-й этап – концентрирование белкового препарата на центрифужных концентраторах Amicon Ultra (Millipore Ltd, США) и гель-фильтрационная хроматография, проводимая на колонке Superdex G-75 10/300 (GE Healthcare) в буферном растворе (500 мМ NaCl, 20 мМ HEPES, pH 7.4, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 0.5 мМ EDTA). Выделение белка Tm₁₀₁₂ состояло только из 1-го и 3-го этапов. Полученные препараты белков концентрировали на центрифужных концентраторах до 15–30 мг/мл.

Скрининг условий кристаллизации. Кристаллизацию белков проводили методом висячей капли посредством диффузии в парах при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ с использованием стандартных наборов для роботизированной кристаллизации глобулярных белков компании Hampton Research: Index HT, Crystal Screen HT, Crystal Screen Cryo HT, PEGRx HT, PEG/Ion HT и SaltRx HT. Непосредственно перед кристаллизацией препараты белков центрифугировали на микроцентрифуге в течение 10 мин со скоростью 18000 об/мин. Кристаллизацию проводили с помощью роботизированной системы кристаллизации макромолекул Rigaku (Япония). Использовали 96-луночные кристаллизационные планшеты, каждая лунка содержала три ячейки, которые позволяли варьировать концентрацию белка в рамках одного условия кристаллизации. Таким образом, один кристаллизационный планшет позволял провести скрининг 288 условий. Фотосъемка кристаллизационных планшетов

осуществлялась по заданному расписанию в автоматическом режиме в течение 8 месяцев. Мониторинг результатов кристаллизации проводился через управляющий сервер системы кристаллизации, а также в удаленном режиме посредством системы удаленного доступа.

Оптимизация условий кристаллизации и получение кристаллов, пригодных для проведения РСА. При оптимизации условий кристаллизации использовали метод висячей капли посредством диффузии в парах. Кристаллизацию проводили в пластиковых 24-луночных планшетах для висячих капель Linbro фирмы Hampton Research с использованием силиконированных стекол диаметром 22 мм фирмы Hampton Research, при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в термостатированной комнате. Для приготовления каждой капли 1.0 мкл белка смешивали с 1.0 мкл кристаллизационного раствора. Объем кристаллизационного раствора в резервуаре был 400 мкл. Появление и рост кристаллов контролировали на первые и третьи сутки, а затем каждые 7 сут с помощью микроскопа Nikon SMZ1000 (Япония) и поляризационного микроскопа Nikon Eclipse 50i POL (Япония).

Сбор и обработка данных РСА. Рентгеноструктурные исследования кристаллов проводили на станции белковой кристаллографии "Белок" на пучке синхротронного излучения накопителя "Сибирь-2" НИЦ "Курчатовский институт". Фокусирующий канал станции был настроен на длину волны излучения 0.9875 Å. Съемку проводили при температуре -173°C с использованием низкотемпературного устройства Cryostream Plus фирмы Oxford Cryosystems. Дифракционную картину от кристаллов регистрировали двумерным CCD-детектором Rayonix SX165 и обрабатывали комплектом программ XDS [19]. Данные высокого разрешения получали в результате объединения наборов снятых с разными временами экспозиции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность К.М. Полякову (институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН) за помощь в проведении РСА и С.В. Шумиловой (Виргинский университет, University of Virginia) за создание плазмидной конструкции для экспрессии белка DJ-1.

Данная работа выполнялась при содействии Государственного Контракта № 16.512.11.2175.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bernal A., Ear U., and Kyripides N. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29(1). P. 126–127.
2. Dunham I. // *Trends Genet.* 2000. V. 16(10). P. 456–461.
3. Bork P. // *Genome Res.* 2000. V. 10(4). P. 398–400.
4. Roberts R.J. // *PLoS Biol.* 2004. V. 2(3). P. 0293–0294.

5. Galperin, M.Y. and Koonin E.V. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32(18). P. 5452–5463.
6. Hermann J.C., Marti-Arbona R., Fedorov A.A., Fedorov E., Almo S.C., Shoichet B.K., Raushel F.M. // *Nature.* 2007. V. 448(7155). P. 775–779.
7. Binkowski T.A., Joachimiak A., Liang J. // *Protein Sci.* 2005. V. 14(12). P. 2972–2981.
8. Laskowski R.A., Watson J.D., Thornton J.M. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 351(3). P. 614–626.
9. Porter C.T., Bartlett G.J., Thornton J.M. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. D129–133.
10. Pellegrini M., Marcotte E.M., Thompson M.J., Eisenberg D., Yeates T.O. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96(8). P. 4285–4288.
11. Marcotte C.J., Marcotte E.M. // *Appl. Bioinformatics.* 2002. V. 1(2). P. 93–100.
12. Van Noort V., Snel B., Huynen M.A. // *Trends Genet.* 2003. V. 19(5). P. 238–242.
13. Grant D., Yin L., Collins J.L., Parks D.J., Orband-Miller L.A., Wisely G.B., Joshi S., Lazar M.A., Willson T.M., Zuercher W.J. // *ACS Chem. Biol.* 2010. V. 5(10). P. 925–932.
14. Kumar A., Chiu H.J., Axelrod H.L., Morse A., Elslinger M.A., Wilson I.A., Deacon A. // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2010. V. 66(10). P. 1309–1316.
15. Gileadi O., Knapp S., Lee W.H., Marsden B.D., Müller S., Niesen F.H., Kavanagh K.L., Ball L.J., von Delft F., Doyle D.A., Oppermann U.C., Sundström M. // *J. Struct. Funct. Genomics.* 2007. V. 8. P. 107–119.
16. Doppelt O., Moriaud F., Bornot A., de Brevern A.G. // *Bioinformatics.* 2007. V. 1(9). P. 357–359.
17. Kahle P.J., Waak J., Gasser T. // *Free Radic. Biol. Med.* 2009. V. 47(10). P. 1354–1361.
18. Carrington J.C., Dougherty W.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85(10). P. 3391–3395.
19. Collaborative Computational Project, Number 4 // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 1994. V. 50(5). P. 760–763.
20. Long F., Vagin A., Young P. and Murshudov G.N. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2008. V. 64(Pt 1). P. 125–132.
21. Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 1997. V. 53(Pt 3). P. 240–255.
22. Emsley P., Cowtan K. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2004. V. 60(Pt 12, Pt 1). P. 2126–2132.

A New Approach for Study of Structural and Functional Properties of Proteins with Unknown Functions

M. A. Gorbacheva*.,*, A. G. Yarosh*, P. V. Dorovatovskiy*, T. V. Rakitina*.,***, K. M. Boiko*.,**, D. A. Korzhenevsky*, A. V. Lipkin*, V. O. Popov**., and I. A. Shumilin******

*Phone: +7 (906) 695-53-60; e-mail: gorbacheva-marina@yandex.ru

*National Research Centre “Kurchatov Institute”, pl. akademika Kurchatova, Moscow, 123182, Russia

**Bach Institute of Biochemistry Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

***Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

****University of Virginia, USA, Charlottesville, Virginia, United States

Selected proteins were produced in *Escherichia coli* bacterial expression system—three proteins from extremophil bacteria: a putative monooxygenase from *Deinococcus radiodurans*, a putative nucleotidyltransferase from *Thermotoga maritima*, a putative oxidoreductase from *Exiguobacterium sibiricum*; and a shaperon from *Homo sapiens* DJ-1. The protocol of isolation & purification of recombinant proteins were developed that allowed to obtain expression products with the purity of no less than 96%. Conditions for the crystallization have been selected that allowed a stable growth of crystals. Preliminary x-ray experiments were conducted in order to confirm the quality of produced crystals; the resolution of obtained structural data was from 1.2 to 1.8 Å.

Keywords: unknown ligand, crystallization, X-ray analysis.