

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ФОСФОПАНТЕТЕИН АДЕНИЛИЛТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ *Mycobacterium tuberculosis* В АПО-ФОРМЕ И В КОМПЛЕКСАХ С КОФЕРМЕНТОМ А И С ДЕФОСФОКОФЕРМЕНТОМ А

© 2012 г. В. И. Тимофеев, Е. А. Смирнова, Л. А. Чупова*, Р. С. Есипов*, И. П. Куранова

Институт кристаллографии РАН, Москва
E-mail: inna@ns.crys.ras.ru

**Институт биоорганической химии РАН, Москва*

Поступила в редакцию 15.09.2011 г.

Кристаллы фосфопантетеин аденилилтрансферазы (PPAT) из *Mycobacterium tuberculosis* в апо-форме и в комплексах с коферментом А (PPAT/CoA) и с дефосфокоферментом А (PPAT/dPCoA) получены в условиях невесомости методом встречной диффузии в капилляре. По дифракционным наборам, собранным от выращенных кристаллов, решены структуры PPAT *Mt* в апо-форме и в комплексах с лигандами. Структуры уточнены при разрешении 1.76, 1.59 и 1.59 Å, R_f составили 0.175, 0.159 и 0.157, R_{free} – 0.224, 0.208 и 0.206 соответственно для PPAT, PPAT/CoA и PPAT/dPCoA. Координаты моделей приняты в Международный банк белковых структур (PDB ID: 3RFF, 3RHS, 3RBA). В полученных структурах определены места связывания лигандов, охарактеризовано их окружение, прослежены конформационные изменения, сопровождающие связывание лигандов.

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальный фосфопантетеин аденилилтрансферазы (PPAT) участвует в биосинтезе кофермента А, катализируя предпоследнюю, четвертую, стадию процесса: образование дефосфокофермента А (dPCoA) из 4'-фосфопантетеина и АТФ (рис. 1). Эта стадия является ключевой, поскольку именно на этом этапе регулируется скорость образования конечного продукта – кофермента А. При этом изменение скорости достигается за счет образования комплекса PPAT с конечным продуктом биосинтеза – коферментом А, когда последний образуется в избытке.

Детальный механизм биосинтеза кофермента А вызывает особый интерес по ряду причин. Кофермент А является незаменимым участником множества метаболических процессов, в частности выступает как главный переносчик ацильных групп. При этом биосинтез кофермента А в высших организмах осуществляется ферментом, отличным от бактериальных PPAT, благодаря чему ферменты из патогенных микроорганизмов могут быть использованы как белки-мишени для конструирования соответствующих антибактериальных лекарств. Существенный вклад в понимание механизма функционирования PPAT вносят данные о пространственной структуре свободного фермента и его комплексов с субстратами, продуктами и ингибиторами реакции.

В настоящей работе с использованием кристаллов, выращенных в невесомости методом

встречной диффузии и дифракционных наборов, собранных от этих кристаллов на синхротроне Spring 8 [1], впервые определена пространственная структура комплекса PPAT с продуктом реакции – дефосфокоферментом А (dPCoA) (разрешение 1.59 Å). Пространственные структуры апоформы PPAT и комплекса PPAT *Mt* с природным ингибитором – коферментом А (CoA), ранее установленные при разрешении 1.99 и 2.1 Å, уточнены при разрешении 1.76 и 1.59 Å соответственно. Обнаружены и описаны детали структуры при более высоком разрешении. Локализовано положение лигандов в молекуле фермента, описано их окружение, выявлены функциональные группы фермента и атомные группы лигандов, непосредственно участвующие в связывании, прослежены конформационные изменения, сопровождающие связывание лигандов. Различия в расположении обоих лигандов рассмотрены в связи с особенностями строения их молекул и выполняемой ими функции в процессе реакции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и очистка PPAT Mt. Рекombинантный микобактериальный фермент получен и очищен, как описано в [2].

Кристаллизация апо-формы PPAT и комплексов с CoA и dPCoA. Кристаллизацию фермента и его комплексов проводили методом встречной диффузии в невесомости, используя методику [3]. Кристаллы выращивали из растворов белка в

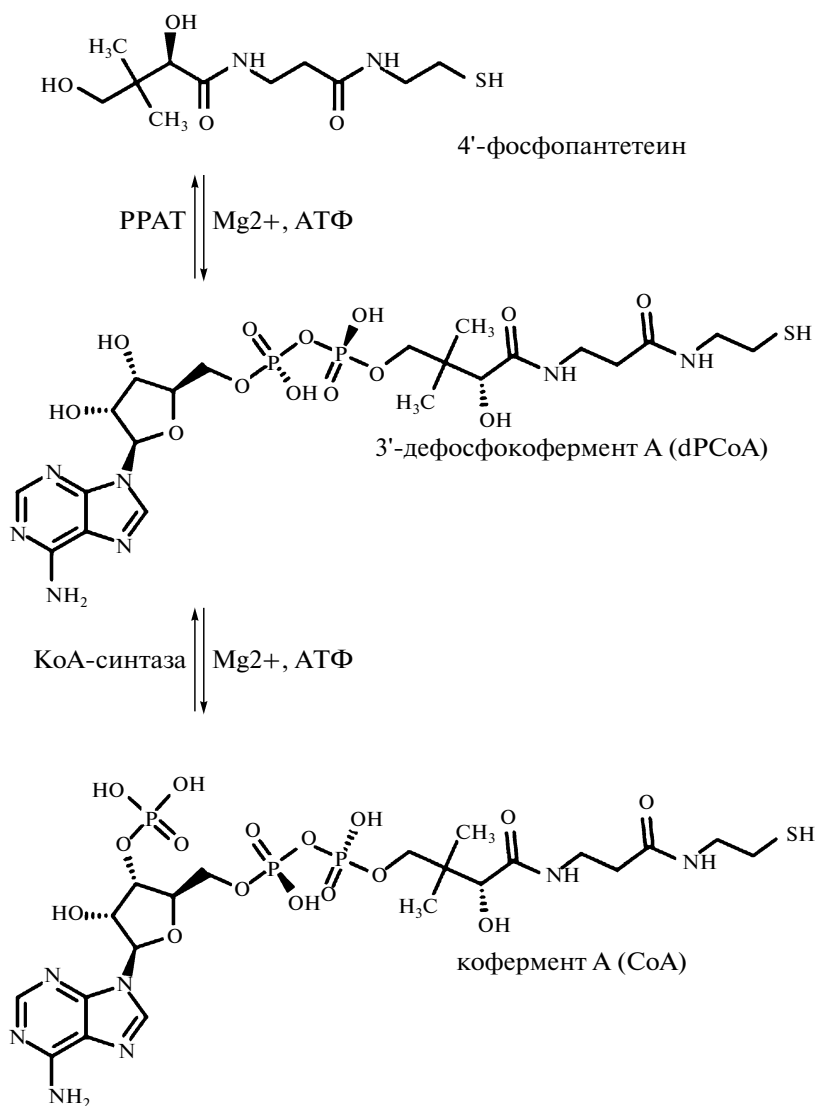


Рис. 1. Две последние стадии биосинтеза CoA.

10 mM HEPES pH 8.0, 0.15M NaCl, 1 mM ДТТ, в качестве осадителя использовали МПД и гексамин кобальта [1]. Кристаллы комплексов получали сокристаллизацией при десятикратном избытке лиганда.

Сбор и обработка дифракционных данных для кристаллов PPAT Mt, PPAT Mt/CoA и PPAT Mt/dPCoA. От выращенных кристаллов при температуре 100 K собраны дифракционные наборы до разрешения 1.60 (апо-форма PPAT Mt), 1.50 (PPAT Mt/CoA) и 1.50 Å (PPAT Mt/dPCoA). Наборы собраны на синхротроне SPring 8, Япония, станция BL41XU. В качестве детектора использовался CCD-детектор Quantum-315. Кристаллы перед съемкой замораживали, используя в качестве криорастора резервуарный раствор, содержащий дополнительно 20% глицерина. Дифракционные данные получены методом вращения одного кристалла.

Длина волны составляла 0.8 Å. Обработку набора экспериментальных интенсивностей проводили с помощью программы HKL-2000 [4]. Все кристаллы принадлежат пр. гр. R32. В независимой части ячейки находится одна субъединица фермента, что говорит об отсутствии асимметрии молекулы при связывании лиганда, наблюдаемой для PPAT Ec [5]. Статистические характеристики набора приведены в табл. 1.

Решение и уточнение структур. Структура апо-формы PPAT Mt, ранее установленная при разрешении 1.99 Å, решена и уточнена при разрешении 1.76 Å; структуры PPAT/CoA и PPAT/dPCoA – при разрешении 1.59Å. Все структуры решены методом молекулярного замещения с использованием программы Phaser [6] и координат апо-фермента при разрешении 1.99 Å (PDB ID: 1TFU) в качестве стартовой модели. Для уточнения ис-

Таблица 1. Статистические характеристики дифракционных наборов апо-формы РРАТ *Mt* и ее комплексов с СоА и dPCoA

Параметры	Исследуемые соединения		
	РРАТ, апо-форма	РРАТ/СоА	РРАТ/dPCoA
Пр. гр.	R32	R32	R32
$a, b, c, \text{Å}$, α, β, γ , град	$a = b = 98.678, c = 113.855$ $\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	$a = b = 98.886, c = 114.869$ $\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	$a = b = 99.224, c = 115.852$ $\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$
Диапазон разрешения, Å	40.0–1.6	40.0–1.5	40.0–1.5
Количество рефлексов	163255	248818	261336
Количество рефлексов на независи- мую часть элементарной ячейки	28293	34704	35955
Повторяемость	5.77	7.17	7.27
Расстояние кристалл–детектор, мм	260	260	260
Угол качания, град	0.5	0.5	0.5
Угол вращения, град	180	180	180
Полнота набора, %	91.0	98.2	98.8
$R_{\text{sym}}(I)$, %	4.4	4.8	4.9
λ (длина волны излучения), Å	0.8	0.8	0.8

Таблица 2. Статистические характеристики уточнения апо-формы РРАТ *Mt* и ее комплексов с СоА и dPCoA

Параметры	Исследуемые соединения		
	РРАТ, апо-форма	РРАТ/СоА	РРАТ/dPCoA
PDB ID	3RFF	3RHS	3RBA
Разрешение	1.76	1.59	1.59
Полнота набора, %	93.5	94.2	95.3
Число уточненных остатков в молекуле	157	157	157
Число уточненных атомов в белковой молекуле	1201	1201	1201
Число уточненных молекул воды	58	63	62
R_{cryst} , %	17.50	15.90	15.79
R_{free} , %	22.40	20.80	20.70
rmsd длин связей, Å	0.006	0.004	0.006
rmsd валентных углов, град	0.889	0.924	1.004
Среднее значение температурного фактора для атомов, Å^2			
основной цепи	40.059	30.498	32.964
боковых групп и молекул воды	43.963	36.652	37.781
Статистика Рамачандрана распределения двугранных углов:			
в наиболее благоприятных областях, %	92.5	91.9	93.4
в разрешенных областях, %	7.5	8.1	6.6
в запрещенных областях, %	0	0	0

пользовали программы Refmac [7] и PHENIX [8]. Ручную правку моделей проводили при помощи программы Coot [9], используя карты электронной плотности, рассчитанные с коэффициентами $2|F_o| - |F_c|$ и $|F_o| - |F_c|$. На картах электронной плот-

ности всех трех структур были локализованы молекулы воды, а в активных центрах комплексов РРАТ/СоА и РРАТ/dPCoA найдены положения лигандов; для обоих лигандов степень заселенности близка к 100%.

В комплексе РРАТ/СоА в электронную плотность хорошо вписываются пирофосфатная группа и пантетеиновая цепь молекулы кофермента, а как плотность для дезоксиаденозиновой группы и 3'-фосфата выражена довольно слабо. В комплексе РРАТ/dPCoA в электронную плотность хорошо вписывается вся молекула dPCoA. Во всех трех структурах отсутствует электронная плотность для аминокислотных остатков 38–42.

Статистические параметры уточнения приведены в табл. 2. Координаты атомных моделей депонированы в Международный банк белковых структур (PDB ID: 3RFF, 3RHS, 3RBA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Строение молекулы апо-фермента. Как было описано ранее [2, 10], молекула РРАТ *Mt* представляет собой гексамер, построенный из шести идентичных субъединиц (рис. 2). Полипептидная цепь в каждой субъединице состоит из пяти-стрэндного параллельного β -слоя и шести α -спиралей. При этом β -стрэнды и α -альфа спирали следуют в топологическом порядке β - α - β - α - β , как в нуклеотидсвязывающем домене, образуя так называемую укладку Россмана (*Rossmann fold*) [11]. Функционально активной формой фермента является гексамер. Субъединицы связаны попарно осями второго порядка, а осью третьего порядка объединены в два тримера. Тройная ось гексамера совпадает с кристаллографической тройной осью, а двойные оси гексамера – с кристаллографическими двойными осями. В центре гексамера имеется заполненный растворителем канал диаметром более 20 Å у поверхности молекулы и 10 Å в зоне контакта тримеров (рис. 2, 3).

Активный центр в каждой субъединице занимает большую полость, расположенную у ее поверхности и обращенную внутрь наполненного растворителем канала. Полость активного центра ограничена стрэндами бета-слоя $\beta 1$, $\beta 4$, $\beta 5$, спиралями $\alpha 1$, $\alpha 4$, N-концевыми участками спиралей $\alpha 3$ и $\alpha 5$ и пятью нерегулярными участками (петли, включающие аминокислотные остатки: 37–46, 118–126, 9–14, 88–94, 69–72). Петля 118–126, ограничивающая активный центр, расположена в зоне контакта тримеров между субъединицами, например Б и Г на рис. 3. Петля 37–46, расположенная у входа в канал с растворителем, локализована плохо, все входящие в нее остатки имеют высокие В-факторы, а для остатков 38–42 электронная плотность вообще отсутствует.

При разрешении 1.76 Å в апо-форме обнаружено двойное положение остатка Thr 118. Несколько иначе по сравнению с моделью при разрешении 1.99 Å ориентированы четыре С-концевых остатка и боковые цепи остатков Glu 132 и Met 135.

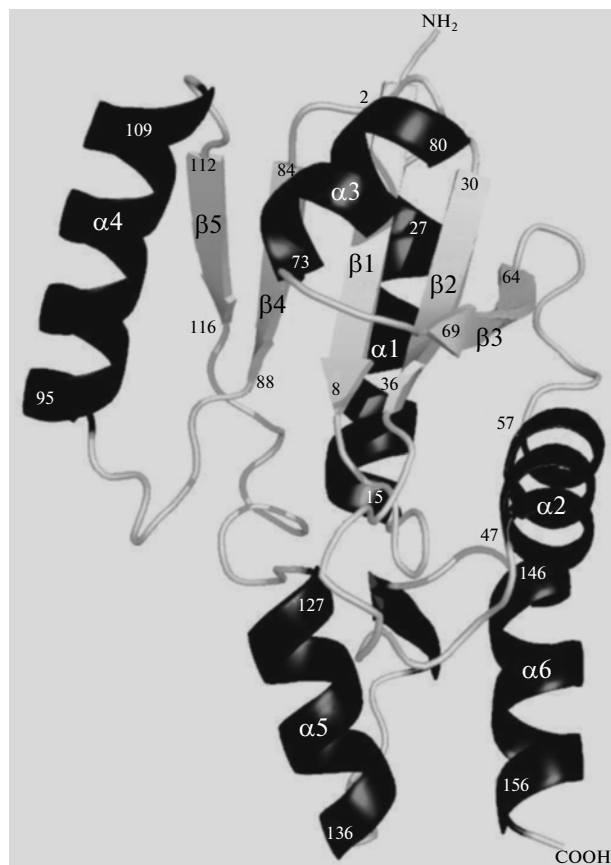


Рис. 2. Укладка полипептидной цепи в субъединице РРАТ *Mt*. Проставлены номера N- и С-концевых аминокислотных остатков в α -спиралях и β -стрэндах.

Строение комплексов РРАТ *Mt* с СоА и dPCoA. Изучение строения комплексов РРАТ с СоА и dPCoA представляет особый интерес. Эти лиганды сходны по строению: СоА отличается от dPCoA только присутствием фосфатной группы в 3'-положении рибозного кольца. Тем не менее функциональная роль их различна: dPCoA является продуктом прямой и субстратом обратной реакции, катализируемой ферментом. Детальное исследование характера связывания его с ферментом важно для понимания механизма катализа. СоА – конечный продукт биосинтеза – на стадии реакции, катализируемой РРАТ, регулирует скорость процесса по принципу обратной связи: при высокой концентрации он связывается в активном центре РРАТ, тем самым прерывая течение реакции. Данные о пространственной структуре комплекса РРАТ/СоА помогают на атомном уровне расшифровать механизм ингибирования фермента.

Проведенное ранее исследование структуры комплекса РРАТ/СоА при разрешении 2.1 Å показало, что СоА связан в полости активного центра и ориентирован таким образом, что в гексамерной молекуле фермента аденильные группы

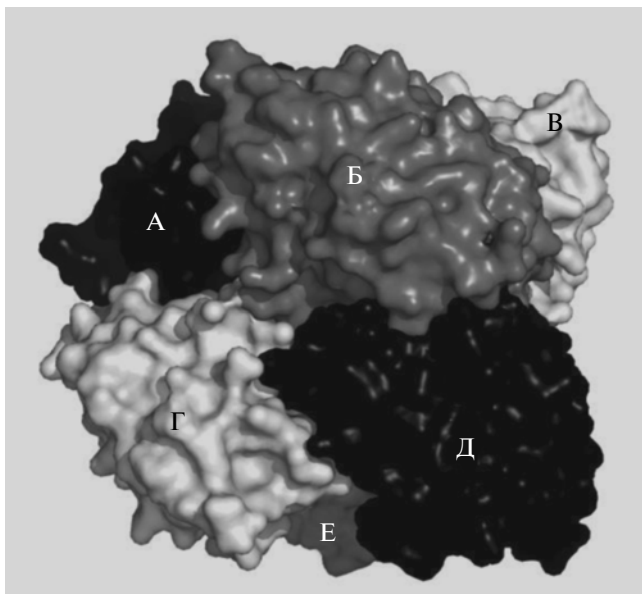


Рис. 3. Гексамерная молекула РРАТ *Mt*. Буквами обозначены субъединицы гексамера.

СоА направлены в сторону заполненного растворителем канала и не взаимодействуют непосредственно с какими-либо группами фермента [2].

По сравнению со структурой при разрешении 2.1 Å в комплексе РРАТ/СоА при разрешении 1.59 Å удалось уточнить положение метильных групп и оксигруппы пантетеиновой цепи, положение дезоксиаденозинового фрагмента и 3'-фосфата дезоксирибозного кольца (рис. 4). Однако и при высоком разрешении атомы аденильного кольца имеют высокие В-факторы и плохо локализованы.

В полости активного центра локализован кластер из девяти молекул воды, связанных водородными связями друг с другом и с аминокислотными остатками Ser 9, Phe 10, Asp 11, Thr 14, His 17, Ser 127 и Ser 128.

Окружение СоА в радиусе ≤ 3.6 Å представлено на рис. 5. Атомы кислорода одного из фосфатов связаны водородной связью с ОН-группой Ser 128 и с молекулой воды, принадлежащей к водному кластеру. Кроме того, пиррофосфатная группа (фосфаты P1 и P2) образует водородные связи с Ser 9 и с тремя принадлежащими к кластеру молекулами воды.

Пантетеиновая цепь, находящаяся в изогнутой конформации, расположена в углублении на поверхности фермента. В отличие от аденозинового кольца молекулы кофермента SH-группа пантетеинового фрагмента жестко фиксирована. Она связана водородными связями с OD1 Asn 105, кислородом Met 101 и сближена с аминокислотными остатками Leu 129 и Val 133 из соседней субъединицы тримера. Кроме того, вблизи SH-



Рис. 4. Расположение СоА в полости активного центра РРАТ *Mt*. Показана электронная плотность для молекулы СоА, рассчитанная с коэффициентами $2|F_o| - |F_c|$.

группы имеется кластер, состоящий из четырех молекул воды, которые связывают SH-группу с Lys 87, Glu98 и Thr 113. Карбонильный кислород пантетеинового фрагмента (атом O5P) стабилизирует конформацию конечного участка пантетеиновой цепи, образуя водородную связь с азотом главной цепи Val 73 и с молекулой воды, дополнительно координированной с остатками Val 73, Val 74, Asn 105.

В то время как СоА является природным ингибитором фермента и регулирует скорость процесса по принципу обратной связи, dPCoA образуется в результате катализируемой РРАТ реакции (рис. 1). Молекула dPCoA, связанная в активном центре фермента, показана на рис. 6.

На рис. 7 представлено окружение dPCoA в радиусе ≤ 3.6 Å. Пантетеиновая цепь dPCoA занимает то же положение в активном центре, что и пантетеиновая цепь СоА. Однако между атомом азота меркаптоэтаноламинового фрагмента и кислородом OE2 Glu 132 из соседней субъединицы тримера обнаружена новая водородная связь. Связывание dPCoA сопровождается изменением структуры водного кластера вблизи аденинового фрагмента молекулы (рис. 7). Заметно меняется окружение пиррофосфатного фрагмента. Кисло-

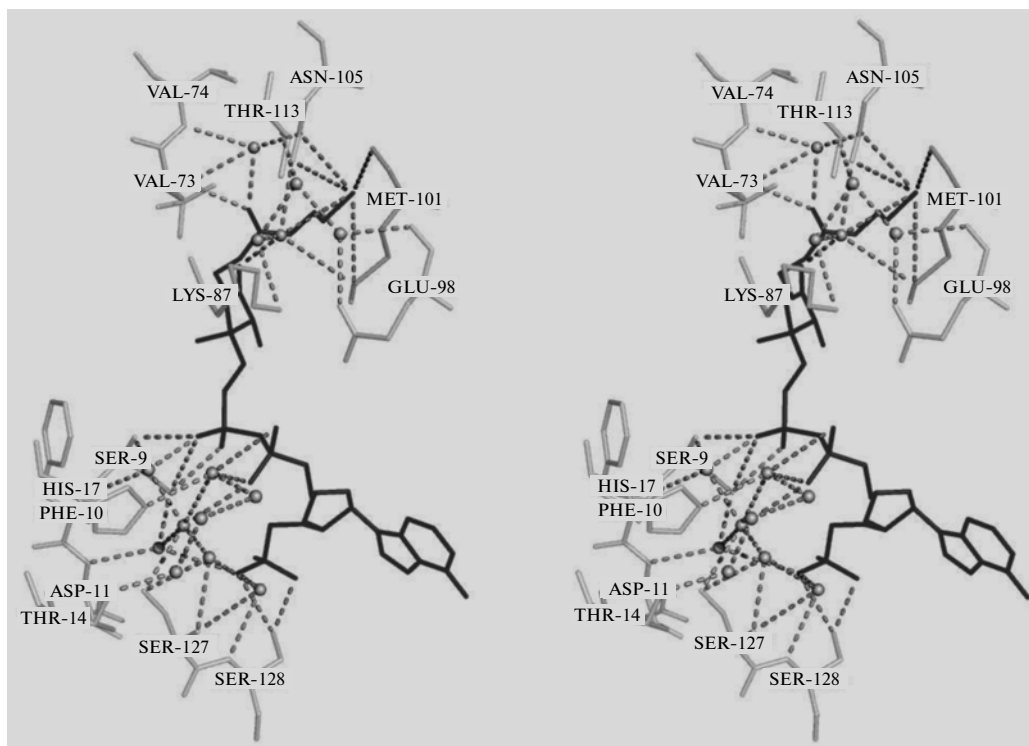


Рис. 5. Стереобразжение окружения CoA в радиусе ≤ 3.6 Å. Водородные связи показаны пунктиром. Сферами изображены молекулы воды. P1, P2 – фосфатные группы пирофосфата.

роды фосфата P1 связаны через молекулу воды с Lys 87 и Gly 98, кислороды фосфата P2 непосредственно связаны с Ser 9, Phe 10 His 17, а через молекулу воды – с Asp 11 и Ser 127. Основное различие наблюдается в положении аденильной группы: 2'-гидроксил рибозного кольца связан водородной связью с кислородом главной цепи Gly 88, а 3'-гидроксил – с этим же атомом кислорода, а через молекулу воды – с боковыми цепями Lys 87, Glu 98 и кислородом фосфата P1. В отличие от CoA адениновое кольцо dPCoA фиксировано несколькими водородными связями. Оно непосредственно связано с аминокислотными остатками Tyr 118, Tyr 122, Val 125 и через молекулы воды – с Thr 14, His 17, Asp 19, Ala 119, Ser 127, Ser 128.

Разница в расположении молекул CoA и dPCoA, представленная на рис. 8, хорошо видна при наложении структур обоих комплексов по C α -атомам. Пантетеиновый фрагмент в обоих комплексах занимает одинаковое положение, в то время как расстояние между аминокислотными остатками аденильных колец в обеих молекулах составляет 15.73 Å, между кислородами рибозных колец – 9.84 Å. Атом фосфора, ближайший к аденильной группе, смещен на 2.94 Å. По сравнению с CoA молекула dPCoA находится в глубине активного центра, а ее аденильная группа приближена к спирали $\alpha 4$.

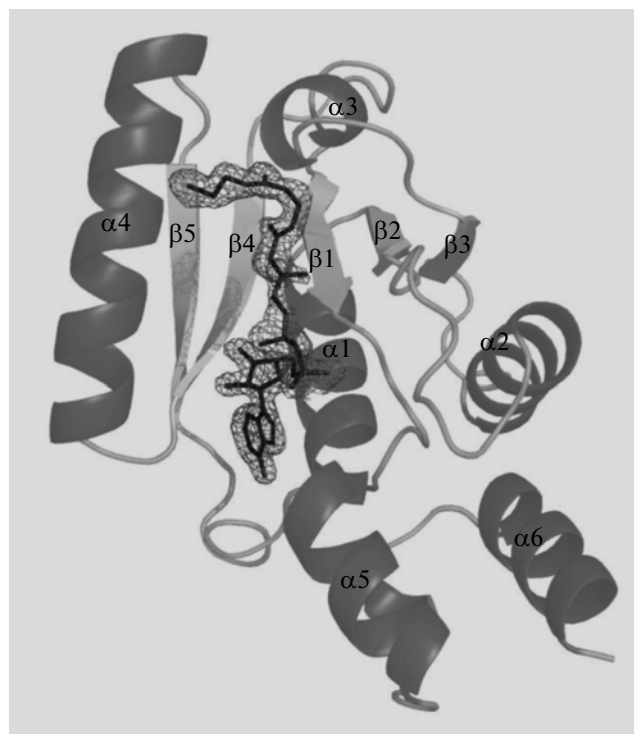


Рис. 6. Расположение dPCoA в полости активного центра PPAT *Mt*. Показана электронная плотность для молекулы dPCoA, рассчитанная с коэффициентами $2|Fo| - |Fc|$.

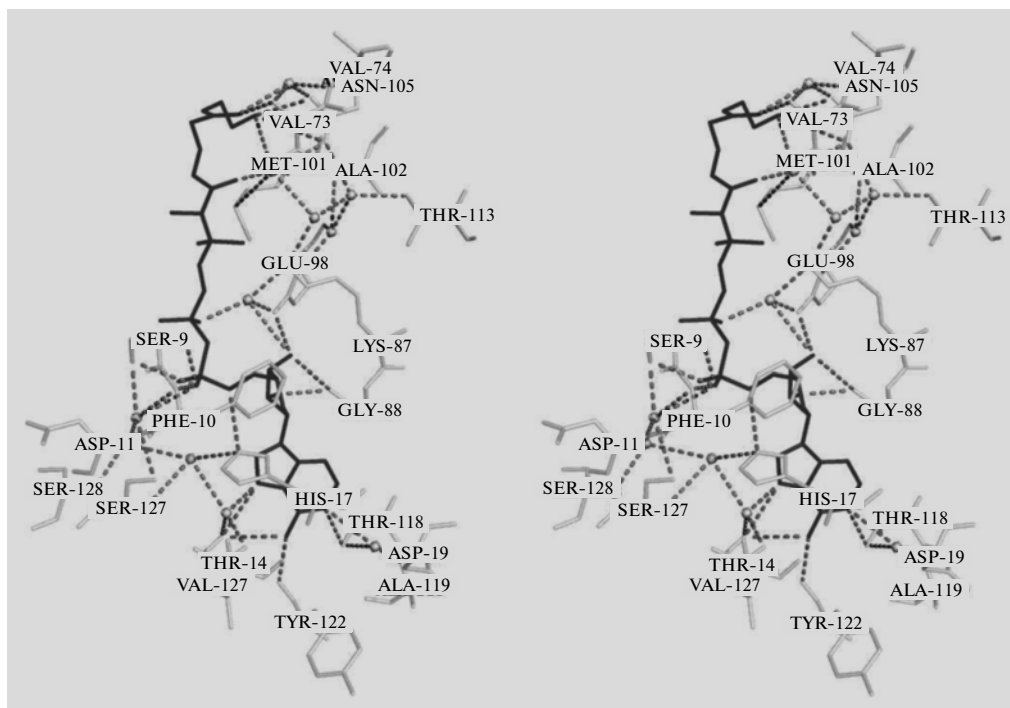


Рис. 7. Стереобразение окружения dPCoA в радиусе ≤ 3.6 Å. Водородные связи показаны пунктиром. Сферами изображены молекулы воды. P1, P2 – фосфатные группы пирофосфата.

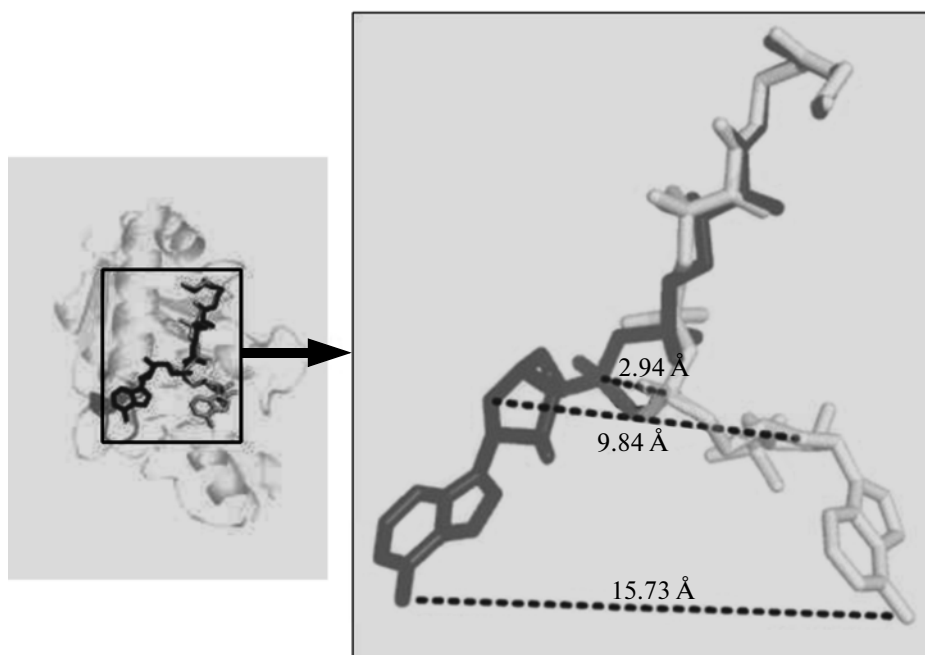


Рис. 8. Взаимное расположение молекул лигандов CoA и dPCoA при совмещении по $C\alpha$ -атомам субъединиц комплексов PPAT/CoA и PPAT/dPCoA.

Изменение конформации фермента при связывании dPCoA. Связывание dPCoA сопровождается значительной конформационной перестройкой участка 89-94. Триггером такой перестройки мо-

жет быть смещение боковой цепи и $C\alpha$ -атома остатка Arg90 из-за стерических препятствий, вызванных связыванием аденильной группы в глубине активного центра (рис. 9). CZ-атомы боко-

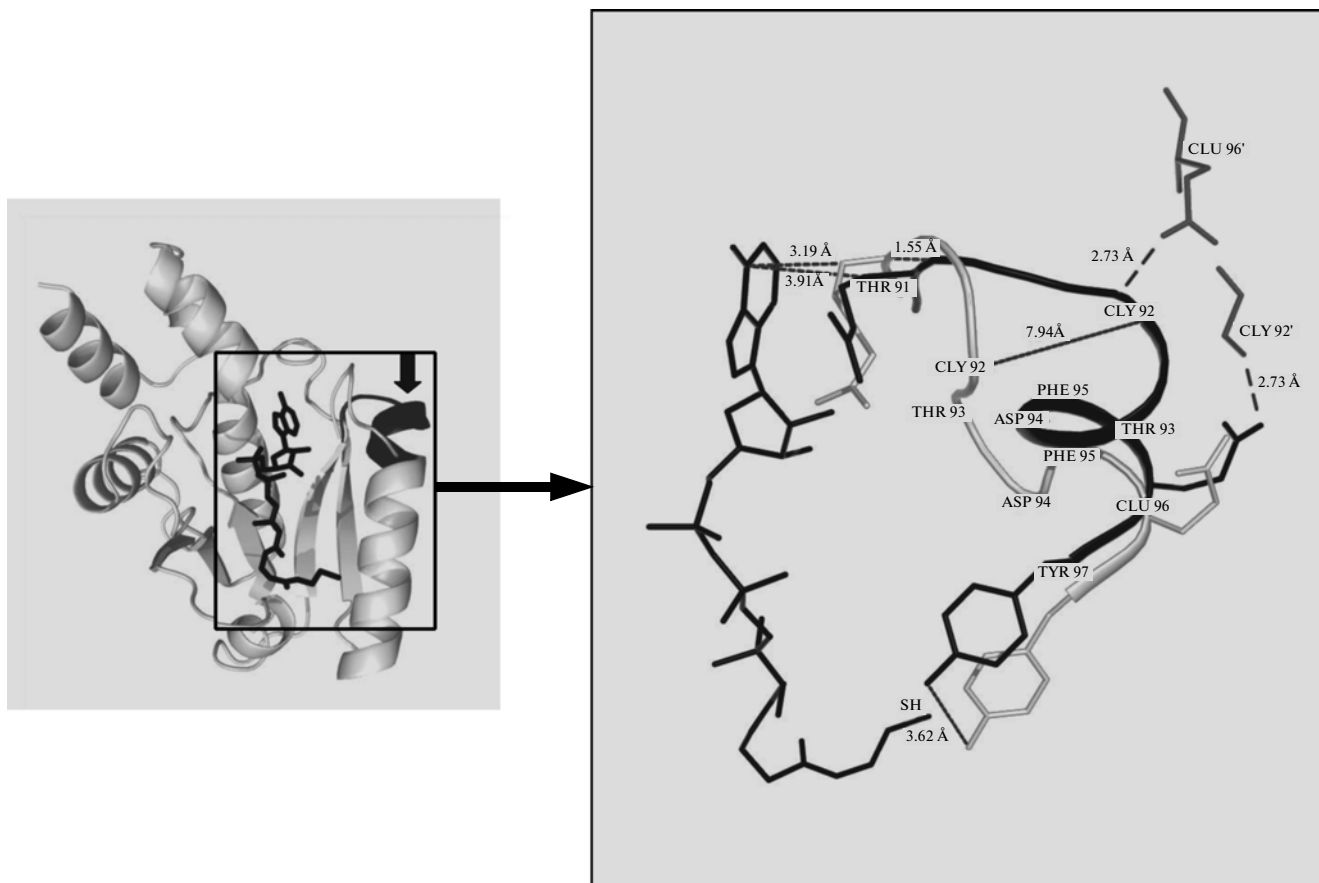


Рис. 9. Конформационные изменения в субъединице апо-фермента при связывании dPCoA. В рамке слева показано расположение молекулы dPCoA в активном центре. Черный цвет и стрелка – участок, претерпевающий конформационное изменение. Справа показаны изменения в конформации полипептидной цепи, сопровождающие связывание dPCoA. Светло-серый цвет – ход полипептидной цепи в апо-ферменте; черный цвет – этот же участок полипептидной цепи после связывания молекулы dPCoA; крупный пунктир – водородные связи, мелкий – величины сдвигов при изменении конформации.

вой цепи Arg90 смещаются на 1.69 Å от своей прежней позиции, а C α -атом основной цепи – на 1.55 Å. Остатки 92–94 меняют свое положение и образуют почти полный виток на N-конце спирали α 4. Новая конформация дополнительно стабилизируется водородными связями между аминокислотными остатками Gly 92–Glu 96' и Glu 96–Gly 92' соседних субъединиц, расположенных вблизи двойной оси димера. Наибольшее смещение – на 7.94 Å – наблюдается для C α -атомов остатка Gly 92. Такая же перестройка происходит при связывании аналога АТФ – α,β -метиленаденозинтрифосфата [12], аденильная группа которого занимает такое же положение, что и аденильная группа dPCoA. При связывании ингибитора (CoA), аденильная группа которого находится у поверхности активного центра и ориентирована в сторону канала, такой перестройки не происходит. Размещение аденильной группы CoA в продуктивной позиции невозможно из-за стерических препятствий, вызванных присут-

ствием фосфатной группы в 3'-положении рибозного кольца. В то же время занимая значительный объем в полости активного центра CoA препятствует вхождению субстрата. Этим и объясняется ингибирующее действие кофермента, который регулирует скорость процесса биосинтеза по принципу обратной связи.

Авторы выражают благодарность японским коллегам М. Sato, Н. Такака, К. Inaka и их сотрудникам за помощь при выращивании кристаллов и получении дифракционных наборов на синхротроне SPring 8.

Работа выполнена при финансовой поддержке ЦНИИМаш Роскосмоса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куранова И.П., Смирнова Е.А., Абрамчик Ю.А. и др. // Кристаллография. 2011. Т. 56. № 5. С. 941.
2. Timofeev V.I., Smirnova E.A., Chupova, L.A. et al. // Crystallography Reports. 2010. V. 55. P. 1050.

3. *Tanaka H., Inaka K., Sugiyama Sh. et al. // J. Synchrotron Rad.* 2004. V. 11. P. 45.
4. *Otwinowski Z., Minor W. // Methods Enzymol.* 1997. V. 276. P. 307.
5. *Izard T. // J. Mol. Biol.* 2002. V. 315. P. 487.
6. *McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Storoni et al. // Acta Cryst. D.* 2005. V. 61. P. 458.
7. *Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. // Acta Cryst.* 1997. V. 53. P. 240.
8. *Adams P.D., Grosse-Kunstleve R.W., Hung L.-W. et al. // Acta Cryst. D.* 2002. V. 58. P. 1948.
9. *Emsley P., Cowtan K. // Acta Cryst. D.* 2004. V. 60. P. 2126.
10. *Morris V.K., Izard T. // Protein Sci.* 2004. V.13. P. 2547.
11. *Rossmann M.G., Liljas A., Branden C.I. et al. // The Enzymes/ Ed. Boyer P.D. 3-rd edn. New York: Academic Press, 1975. V. XI. P. 62.*
12. *Wubben T.J., Mesecar A.D. // Acta Cryst. F.* 2011. V. 67. P. 541.