

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ  
СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.737

Посвящается памяти Б.К. Вайнштейна

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСА КАТАЛАЗЫ  
*PENICILLIUM VITALE* С АМИНОТРИАЗОЛОМ

© 2011 г. А. А. Боровик, А. И. Гребенко, В. Р. Мелик-Адамян

Институт кристаллографии РАН, Москва

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

Поступила в редакцию 25.06.2010 г.

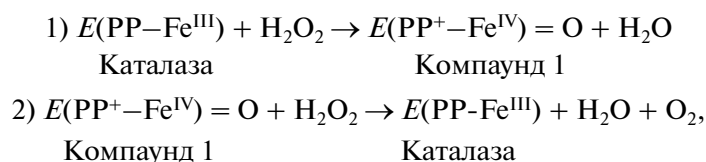
Методами рентгеновской кристаллографии белков определена и уточнена пространственная структура комплекса фермента каталазы *Penicillium vitale* с ингибитором аминотриазолом. Анализ пространственной структуры комплекса показал, что ингибирование фермента происходит в результате ковалентного связывания аминотриазола с аминокислотным остатком His64 в активном центре фермента. При исследовании пространственной структуры комплекса были более точно идентифицированы аминокислотные остатки фермента и обнаружены места связывания молекулой белка сахаридных остатков и ионов кальция.

## ВВЕДЕНИЕ

Каталаза ( $H_2O_2:H_2O_2$ -оксидоредуктаза, ЕС 1.11.1.6) – фермент, осуществляющий разложение перекиси водорода на воду и молекулярный кислород. Он присутствует в клетках всех аэробных организмов и защищает живые клетки от токсических эффектов перекиси водорода, образующейся в различных реакциях метаболизма.

Описание биохимических и структурных свойства каталаз, выделенных из разных видов организмов, можно найти в одном из последних

обзоров на эту тему [1]. Известны каталазы, содержащие в активном центре гемогруппу, и каталазы, содержащие в активном центре два атома марганца. Наиболее изучены гемсодержащие каталазы, в которых реакция разложения перекиси водорода проходит в две стадии. На первой стадии молекула перекиси водорода окисляет фермент, образуя так называемый Компаунд-1 и молекулу воды, а на второй – другая молекула перекиси водорода восстанавливает фермент с образованием молекулярного кислорода:



где  $E$  – белковая часть фермента,  $PP$  – протопорфирин IX гемогруппы.

В организме человека каталазы играют защитную роль в воспалительных процессах и вовлечены в процесс окисления спиртов. Генетическое нарушение синтеза каталазы вызывает наследственную болезнь – акаталаземию [2].

В настоящее время исследованы пространственные структуры девяти гемсодержащих каталаз из различных организмов, среди которых одной из первых была определена пространственная структура каталазы микрогриба *Penicillium vitale* (PVC) [3, 4]. Структурные исследования показали, что все гемовые каталазы представляют собой тетрамерные белки, молекулы которых имеют сим-

метрию 222. Однако по размеру субъединиц они делятся на две группы: “большие”, содержащие в субъединице более 650 аминокислотных остатков, и “малые”, содержащие менее 500 аминокислотных остатков. Кроме того, “большие” каталазы, в том числе и PVC, в активном центре содержат модифицированную гемогруппу, так называемый гем- $d$  с *цис*-гидрокси спиролактоновой группой, присоединенной к пиррольному кольцу III протопорфина [5].

Из биохимических исследований известно, что аминотриазол (АТ) необратимо ингибирует ферментативную активность каталазы [6]. Структурная формула АТ приведена на рис. 1. Ранее была определена пространственная структура комплек-

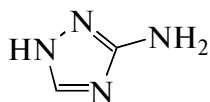


Рис. 1. Структурная формула ингибитора каталазы 3-амино-1,2,4-триазола.

са АТ с одной из “малых” катализ, выделенной из эритроцитов человека [7]. Поскольку PVC относится к группе “больших” катализ, представляло интерес провести исследование пространственной структуры фермент-ингибиторного комплекса PVC с АТ (PVC-АТ).

В данной работе структура комплекса PVC-АТ определена с разрешением 1.8 Å. Кроме того, за время, прошедшее после исследования пространственной структуры PVC, многие программы рентгеновской кристаллографии белков были усовершенствованы, и стало возможным уточнить ранее построенную атомную модель белка. В результате исследования комплекса PVC-АТ в аминокислотную последовательность PVC, ранее определенную по рентгеновским данным, было внесено несколько существенных уточнений: заменены некоторые аминокислотные остатки, лучше соответствующие распределению электронной плотности, найдены места связывания нескольких остатков N-глюкозамина и ионов кальция.

Координаты атомов и структурные факторы исследованного комплекса помещены в Protein Data Bank с кодом доступа 2XF2.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение кристаллов комплекса.** Фермент PVC был выделен и очищен по методике, описанной в [8]. Ингибирование фермента осуществлялось по методу Ченга и Шредера [6] с небольшими изменениями. Раствор, содержащий белок в концентрации 3 мг/мл и 80 мМ АТ, выдерживали при температуре 37°C в присутствии 50 мМ Na-фосфатного буфера pH 7.0 и 5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. После шести часов каталитическая активность фермента составляла лишь 2–3% от первоначального уровня.

Кристаллы комплекса PVC-АТ получали методом диффузии паров в висячей капле при комнатной температуре с осаждающим противораствором, содержащим 38% MPD в 0.05 М натрий-ацетатном буфере pH 5.2. Перед кристаллизацией капли раствора белка в том же буфере (концентрация белка 25 мг/мл, объем капли 5–7 мкл) смешивали с раствором осадителя в отношении 1:1.

**Измерение интенсивностей дифракционных отражений.** Интенсивности дифракционных отражений от кристаллов комплекса PVC-АТ были измерены в Европейской лаборатории молекулярной

биологии (EMBL, Гамбург) на синхротронном излучении с длиной волны 0.91 Å при комнатной температуре. Обработка дифракционных данных сделана с использованием программ DENZO и SCALEPACK [9]. Статистические характеристики полученных экспериментальных данных приведены в табл. 1. Кристаллы комплекса PVC-АТ принадлежат к тригональной пр. гр. P3<sub>1</sub>21 с параметрами элементарной ячейки  $a = b = 144.4$ ,  $c = 133.8$  Å, в независимой части элементарной ячейки содержится половина молекулы белка.

**Определение структуры комплекса фермент-ингибитор.** Кристаллы PVC-АТ оказались изоморфны кристаллам нативного белка, поэтому фазы структурных факторов вначале были рассчитаны по атомной модели ранее определенной структуры PVC [3], а затем уточнены с использованием программного комплекса CCP4 [10] и программы уточнения REFMAC [11]. Изменение и дополнение атомной модели, включая замену неправильно идентифицированных ранее аминокислотных остатков, осуществляли на основе карт разностных синтезов Фурье электронной плотности, рассчитанных с коэффициентами ( $2Fo - Fc$ ) и ( $Fo - Fc$ ), где  $Fo$ ,  $Fc$  – экспериментальные и рассчитанные модули структурных факторов соответственно. Правку модели осуществляли с помощью графических программ O [12] и COOT [13]. Найденные координаты атомов АТ, углеводных остатков и ионов Са были включены в атомную модель комплекса в последующих циклах уточнения. Статистические характеристики уточненной атомной модели комплекса PVC-АТ приведены в табл. 1.

Уточненная модель включает в себя находящиеся в независимой части элементарной ячейки две из четырех одинаковых субъединиц молекулы. Каждая из субъединиц фермента содержит 5433 неводородных атома аминокислотных остатков, 44 атома гема и шесть атомов АТ. Аминокислотный остаток Arg109, локализованный в области расположения некристаллографической оси симметрии 2-го порядка  $r$ , представлен в модели в двух положениях. Кроме того, в модель включены шесть остатков N-ацетилглюкозамина, шесть ионов Са и 902 молекулы воды. Расположение ионов Са и остатков N-ацетилглюкозамина показано на рис. 2.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

**Место связывания молекулы ингибитора.** В кристалле комплекса PVC-АТ в независимой части содержатся две субъединицы фермента. В каждой из них на картах электронной плотности, рассчитанных с коэффициентами ( $2Fo - Fc$ ) и фазами структурных факторов кристаллов нативного белка, была обнаружена область дополнительной электронной плотности, расположенная вблизи

гема, на его дистальной стороне между пиррольным кольцом III порфирина и His64, которая хорошо соответствовала молекуле ингибитора АТ (рис. 3). После уточнения структуры комплекса выяснилось, что ингибитор АТ связан ковалентной связью с атомом NE2 His64 и водородной связью с атомом OD1 Asn137. Таким образом, АТ, связываясь с двумя аминокислотными остатками в активном центре фермента, участвующими в ферментативной активности, заменяет две молекулы воды нативной структуры PVC.

При этом связывание молекулы АТ почти не меняет расположения ближайших аминокислотных остатков в активном центре. Наибольшие изменения, вызванные связыванием ингибитора АТ, – это сдвиги атомов CE1 Phe142 на 0.7 Å и CZ Phe143 на 0.4 Å.

В каталазе эритроцитов человека, ингибированной АТ, ингибитор был обнаружен только в 2-х из 4-х субъединиц фермента. При этом молекула АТ, связываясь ковалентно с соответствующим His 75, располагалась в активном центре немного иначе, чем в PVC. Относительное смещение на 3–4 Å вызывало поворот боковой цепи Asn148 на 180° и совсем не меняло положения соответствующих боковых цепей остатков Phe153 и Phe154 [7].

Существуют две гипотезы о механизме реакции ингибирования АТ [14]. Первая предполагает активацию гистидина, который затем подвергается избирательной нуклеофильной атаке со стороны АТ. Вторая предполагает двухэлектронное окисление АТ, приводящее к образованию электрофильного промежуточного соединения, которое затем реагирует с имидазольной группой гистидина. Полученные структурные данные не позволяют однозначно решить, какое из упомянутых предположений верно, но образование водородных связей АТ в активном центре, приводящее к тому, что атом C5 аминотриазола располагается в непосредственной близости к атому NE2 остатка His64, может служить аргументом в пользу второго предположения.

**Места связывания сахаридов.** Известно, что некоторые каталазы представляют собой гликопротеины, т.е. белки, содержащие сахаридные цепи [17]. Сахариды в гликопротеинах могут изменять физико-химические свойства белков, такие как растворимость и заряд, служить сайтом связывания в механизме молекулярного распознавания в клетках и играть определенную роль в процессах сборки белковой молекулы [15, 16]. Вместе с тем ни в одной из пространственных структур каталаз, определенных до настоящего времени, сахариды не были обнаружены. Не были они обнаружены и при первом исследовании пространственной структуры PVC [3]. Однако в настоящем исследовании пространственной структуры этого фермента с более высоким разрешением в каждой

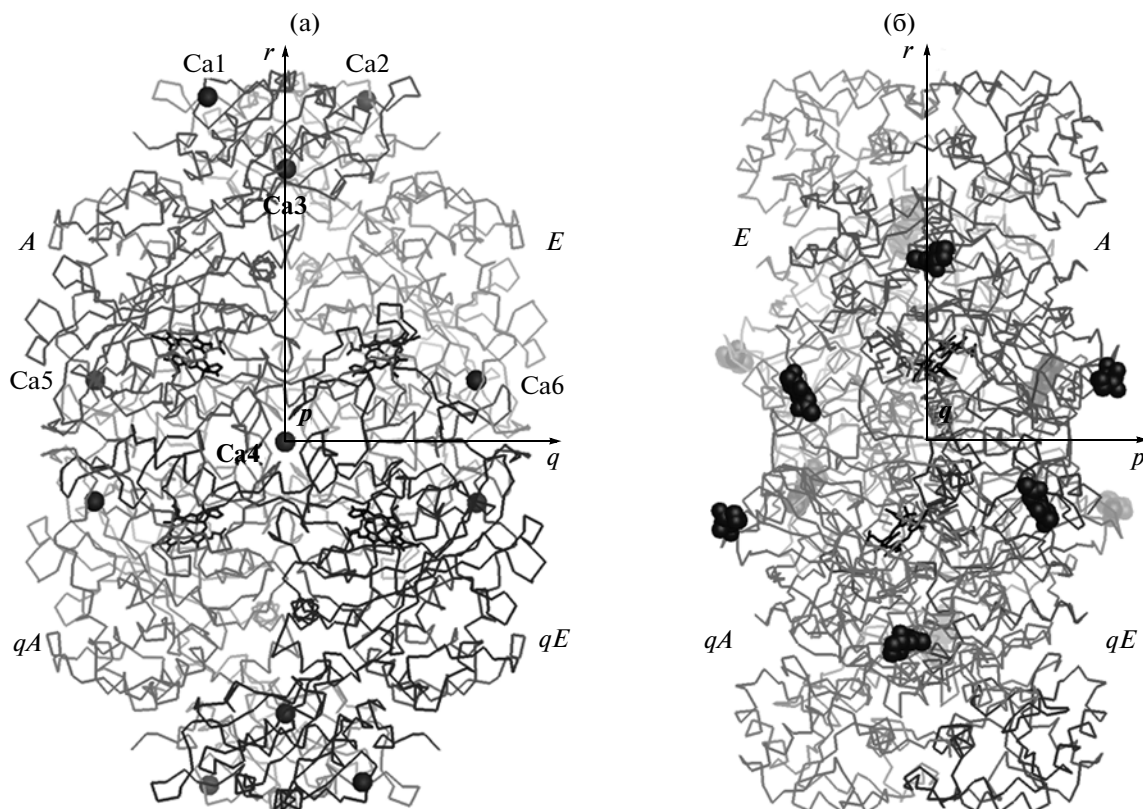
**Таблица 1.** Характеристики экспериментальных данных и уточненной модели комплекса PVC-АТ

Сингония, пр. гр.	тригональная, $P3_121$
$a$ , Å	144.3
$c$ , Å	133.8
Статистические характеристики набора дифракционных данных*	
Область разрешения, Å	30–1.8 (1.83–1.80)
Число измеренных независимых рефлексов	149 308 (10926)
Средняя повторяемость	5.0 (3.7)
$R_{merge}$ , %	8 (31)
$\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle$	20.9 (4.4)
Полнота набора %	98.9 (96.1)
Статистические характеристики уточненной модели	
$R_{crist}$ , %	14.9
$R_{free}$ , %	17.3
Оценка точности координат, DPI [18], Å	0.099
Показатель качества модели, G-фактор [19]	0.11
Число атомов белка	10866
Число молекул воды	902
Число атомов гема	88
Число атомов аминотриазола	12
Число атомов N-ацетилглюкозамина	84
Число ионов Са	6
Среднеквадратичные отклонения от идеальных значений	
межатомных длин связей, Å	0.010
межатомных углов связей, град	1.248
Температурные факторы атомов	
основной цепи, Å <sup>2</sup>	15.48
боковой цепи, Å <sup>2</sup>	17.12
молекул воды, Å <sup>2</sup>	24.88

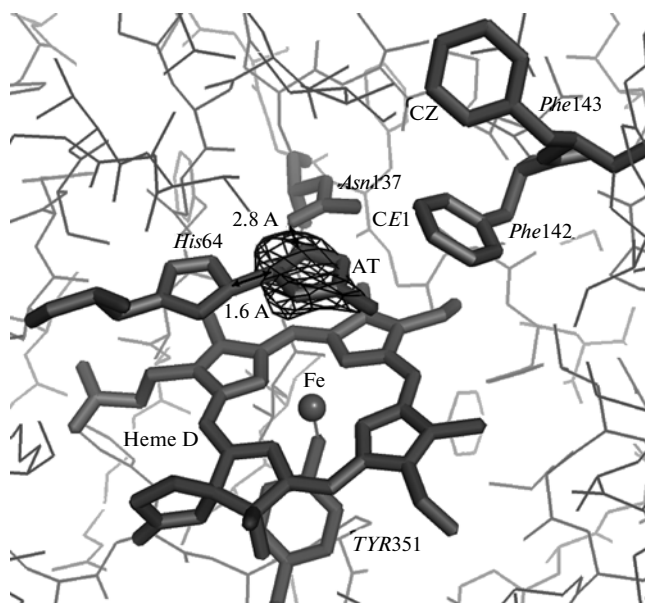
\* Значения в скобках соответствуют последнему слою по разрешению.

из субъединиц были найдены три остатка N-ацетилглюкозамина, связанные с аминокислотными остатками Asn81, Asn410 и Asn513. Все они расположены на поверхности молекулы и направлены в межмолекулярное пространство, занятое неупорядоченным растворителем. На рис. 2б показано расположение остатков N-ацетилглюкозамина в молекуле белка. Распределение электронной плотности, соответствующее остатку N-ацетилглюкозамина, связанному с аминокислотным остатком Asn410, показано на рис. 4.

**Места связывания ионов Са.** Анализ распределения электронной плотности в независимой ча-



**Рис. 2.** Две проекции молекулы PVC. Молекула белка состоит из четырех идентичных субъединиц (*A*, *E*, *qA*, *qE*). Оси *p*, *q*, *r* – молекулярные оси симметрии второго порядка. В независимой части элементарной ячейки расположены субъединицы *A* и *E*, две другие субъединицы *qA* и *qE* связаны с ними осью *q*, совпадающей с кристаллографической осью симметрии: места связывания ионов Ca (а), места связывания остатков N-ацетилглюкозамина (б).

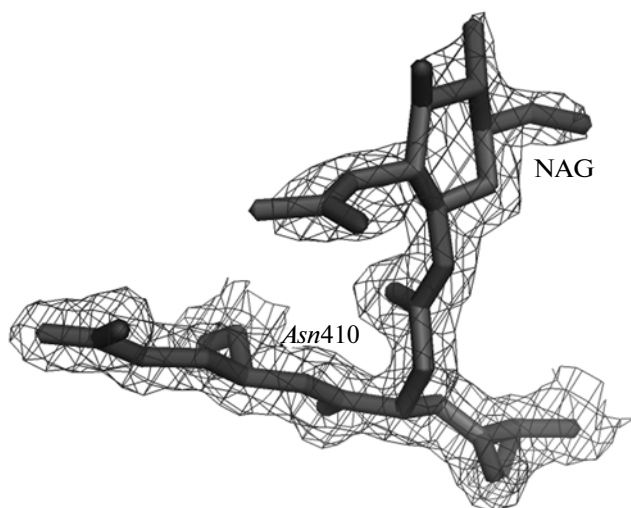


**Рис. 3.** Активный центр PVC с ингибитором AT. Молекула AT связывается ковалентно с атомом NE2 остатка *His64* и водородной связью с атомом OD1 остатка *Asn137*. Показан синтез электронной плотности, рассчитанный после уточнения атомной модели белка без ингибитора AT с коэффициентами ( $F_o - F_c$ ), уровень  $7\sigma$ .

сти элементарной ячейки, соответствующей половине белковой молекулы, выявил шесть пиков с повышенными значениями электронной плотности, которые были интерпретированы как ионы Ca.

Основанием для такой интерпретации послужило то, что эти пики были окружены атомами кислорода, находящимися от них на расстояниях 2.3–2.5 Å и входящими в состав локализованных молекул воды, карбонильных групп полипептидной цепи или боковых групп аминокислотных остатков. Кроме того, атомы Ca, помещенные в центры этих пиков, после уточнения атомной модели имели температурные факторы, сравнимые с температурными факторами окружающих их атомов.

Расположение ионов Ca в молекуле белка показано на рис. 2а, где они обозначены как Ca1–Ca6. В табл. 2 перечислены их координационные числа, средние расстояния Ca–O и аминокислотные остатки, связанные с ионами Ca через карбонильный кислород или через водородные связи окружающих их молекул воды. Ионы Ca1 и Ca2 связаны с белком через атомы кислорода карбонильных групп аминокислотных остатков *Ser653*, *Arg655* и *Val658*, принадлежащих субъединицам *A* и *E* соответственно. Ион Ca3 расположен на некри-



**Рис. 4.** Остаток N-ацетилглюкозамина (NAG), связанный с аминокислотным остатком *Asn410*. Показана электронная плотность, рассчитанная с коэффициентами ( $2Fo-Fc$ ), уровень  $2\sigma$ .

сталлографической оси симметрии, связывающей субъединицы *A* и *E*. Он окружен восемью молекулами воды, шесть из которых связаны водородными связями с аминокислотными остатками *Gln245*, *Asn624* и *Asp628* двух соседних субъединиц. Ион *Ca4* расположен в центре молекулы белка и окружен шестью молекулами воды, две из которых связаны водородными связями с карбонильной группой остатка *Gly360* всех четырех субъединиц. Ион *Ca5* связан с карбонильным кислородом аминокислотного остатка *Thr432* и через связанную воду с остатком *Asp146* субъединицы *A* и остатками *Asn29*, *Ser30*, *Ser32* и *Gln35* субъединицы *E*. Ион

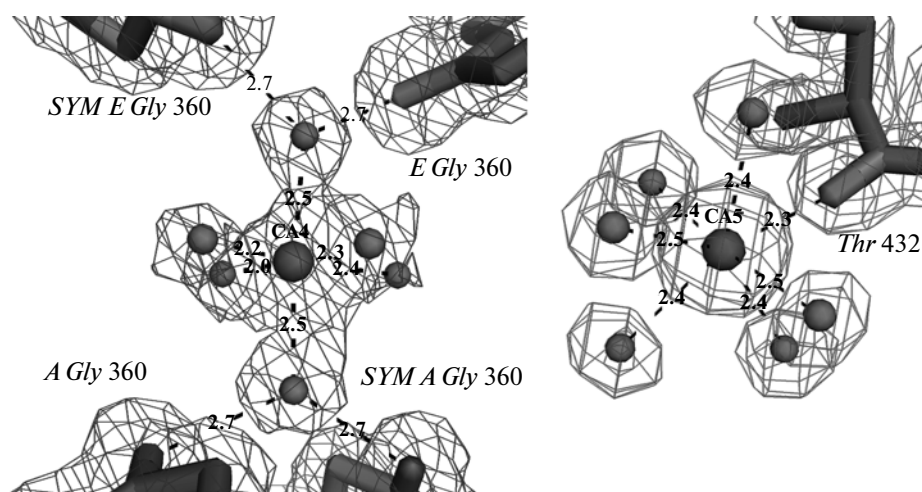
**Таблица 2.** Места связывания ионов Ca

Ион	Координационное число	Среднее расстояние Ca–O	Аминокислотные остатки*
Ca1	4	2.38	<b>Ser653, Arg655, Val658</b> ( <i>A</i> )
Ca2	3	2.62	<b>Ser653, Arg655, Val658</b> ( <i>E</i> )
Ca3	8	2.20	<i>Gln245, Asn624, Asp628</i> ( <i>A</i> и <i>E</i> )
Ca4	6	2.27	<i>Gly360</i> ( <i>A, E, qE, qA</i> )
Ca5	7	2.41	<i>Asp146, Thr432</i> ( <i>A</i> ) <i>Asn29, Ser30, Ser32, Gln35</i> ( <i>E</i> )
Ca6	7	2.43	<i>Asp146, Thr432</i> ( <i>E</i> ) <i>Asn29, Ser30, Ser32, Gln35</i> ( <i>A</i> ),

\* Аминокислотные остатки, связанные с ионами Ca через карбонильный кислород, выделены жирным шрифтом, остальные аминокислотные остатки связаны с ионами Ca через водородные связи окружающих их молекул воды. В скобках указаны субъединицы, которым принадлежат аминокислотные остатки, *A* и *E* – субъединицы, расположенные в независимой части элементарной ячейки; *qA* и *qE* – субъединицы, связанные с субъединицами *A* и *E* кристаллографической осью симметрии *q* (рис. 2а).

*Ca6* точно так же связывает разные участки двух субъединиц с той только разницей, что субъединицы *A* и *E* меняются местами. Распределение электронной плотности вокруг ионов *Ca4* и *Ca5* показано на рис. 5.

Наличие ионов Ca и сахаридов в молекуле PVC является уникальной особенностью PVC среди каталаз с исследованными пространственными структурами и, по-видимому, способствует стабильности фермента и его растворимости.



**Рис. 5.** Распределение электронной плотности вокруг ионов кальция *Ca4* и *Ca5*. Показана электронная плотность, рассчитанная с коэффициентами ( $2Fo-Fc$ ), уровень  $2\sigma$ . Атомы кислорода воды, координирующие ионы Ca, показаны сферами: ион кальция *Ca4*, координированный шестью атомами кислорода воды (а), ион кальция *Ca5*, координированный шестью атомами кислорода воды и атомом O остатка *Thr432* (б).

Авторы выражают благодарность В.В. Барынину, Г.Н. Муршудову и А.А. Вагину за помощь и полезные советы при выполнении этой работы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chelikani P., Fita I., Loewen P.C.* // Cell. Mol. Life Sci. 2004. V. 61. P. 192.
2. *Ogata M.* // Hum. Genet. 1991. V. 86(4). P. 331.
3. *Vainshtein B.K., Melik-Adamyan W.R., Barynin V.V. et al.* // J. Mol. Biol. 1986. V. 188. P. 49.
4. *Мелик-Адамян В.Р., Барынин В.В., Вагин А.А. и др.* // Кристаллография. 1987. Т. 32. №3. С. 638.
5. *Murshudov G.N., Grebenko A.I., Barynin V. et al.* // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 8863.
6. *Chang J.Y., Schroeder W.A.* // Arch. Biochem. Biophys. 1972. V. 148. P. 505.
7. *Putnam C.D., Arvai A.S., Bourne Y., Tainer J.A.* // J. Mol. Biol. 1999. V. 296. P. 295.
8. *Gulyi M.F., Gudkova L.V., Degtyar R.G. et al.* // Doklady Acad. Nauk USSR. 1975. V. 225. P. 211.
9. *Otwinowski Z., Minor V.* // Methods Enzymol. 1997. V. 276. P. 307.
10. Collaborative Computational Project, Number 4. // Acta Cryst. D. 1994. V. 50. P. 760.
11. *Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J.* // Acta Cryst. D. 1997. V. 53. P. 240.
12. *Jones T.A., Zou J.Y., Cowan S.W., Kjeldgaard M.* // Acta Cryst. A. 1991. V. 47. P. 110.
13. *Emsley P., Cowtan K.* // Acta Cryst. D. 2004. V. 60. P. 2126.
14. *Schonbaum G.R., Chance B.* // Enzymes. New York: Academic Press, 1976. V. 13. P. 363.
15. *Sharon N.* // Progr. Biotechnology. 1995. V. 10. P. 1.
16. *Hammond C., Braakman I., Helenius A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 913.
17. *Pegg M., Crane D., Masters C.* // Biochem. Int. 1986. V. 12. P. 831.
18. *Cruickshank W.J.* // Macromolecular Refinement. Proc. of the CCP4 Study Weekend January 1996. P. 11.
19. *Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M.* // J. Appl. Cryst. 1993. V. 26. P. 283.