

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

Посвящается памяти Б.К. Вайнштейна

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА РЕКОМБИНАНТНОЙ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Т ИЗ *THERMOACTYNO MYCES VULGARIS*, НЕ СОДЕРЖАЩЕЙ СВЯЗАННЫХ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

© 2011 г. В. Х. Акпаров, В. И. Тимофеев*, И. П. Куранова*

Государственный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

E-mail: valery@akparov.ru

*Институт кристаллографии РАН, Москва

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

Поступила в редакцию 09.03.2011 г.

Рекомбинантная карбоксипептидаза Т (КПТ) из *Thermoactinomyces vulgaris* была закристаллизована методом встречной диффузии в капилляре в отсутствие ионов кальция. По дифракционному набору, собранному от кристаллов фермента на синхротроне SPring-8, пространственная структура КПТ была установлена при разрешении 1.69 Å и уточнена до $R_{\text{fact}} = 16.903\%$; $R_{\text{free}} = 18.165\%$. Координаты модели приняты в Международный банк белковых структур (PDB ID: 3QNV). При сравнении полученной структуры с ранее установленной структурой природной КПТ, содержащей связанные ионы кальция, обнаружен ряд конформационных изменений как в центрах связывания кальция, так и в активном центре фермента. На основании результатов сравнения рассматриваются возможные причины различной каталитической активности обеих форм фермента.

ВВЕДЕНИЕ

Белки семейства карбоксипептидаз катализируют отщепление С-концевого аминокислотного остатка от белков и пептидов. Карбоксипептидаза Т (КПТ) из *Thermoactinomyces vulgaris* относится к металлокарбоксипептидазам, содержащим в активном центре вовлеченный в катализ ион цинка. КПТ имеет соответственно 30 и 27% идентичных аминокислотных остатков с панкреатическими металлокарбоксипептидазами А (КПА) и В (КПВ) и является их отдаленным гомологом [1]. Пространственная структура природной КПТ, установленная при разрешении 2.3 Å [2], оказалась весьма сходной со структурами КПА и КПВ. Несмотря на сходство пространственных структур, КПА КПВ и КПТ заметно отличаются по субстратной специфичности. КПА отщепляет объемистые гидрофобные С-концевые остатки, КПВ – положительно заряженные, а КПТ обладает смешанной специфичностью, расщепляя оба типа субстратов, но с меньшими скоростями, чем КПА и КПВ. Благодаря этим свойствам КПТ является удобным объектом для изучения структурных основ специфичности.

В ряде работ было показано, что на субстратную специфичность ферментов могут оказывать влияние не только те аминокислотные остатки, которые непосредственно контактируют с субстратом, но и удаленные от него [3, 4]. При кинетическом исследовании гидролиза субстратов карбоксипептидазой Т было показано, что кинетические параметры гидрофобных и заряженных субстратов значительно изменяются, если с ферментом связаны ионы кальция [5]. Рентгеновское исследование пространственной структуры природной КПТ показало, что, в отличие от КПА и КПВ, молекула фермента содержит четыре связанных иона кальция [2]. Чтобы проследить возможные различия в структуре фермента с заполненными и свободными кальциевыми центрами, в настоящей работе получена рекомбинантная КПТ. В отсутствие ионов кальция выращены ее кристаллы, и пространственная структура бескальциевой КПТ установлена при разрешении 1.69 Å. Проведено сравнение пространственных структур кальцийсодержащего фермента и фермента, из которого удалены ионы кальция. На основе анализа обнаруженных конформационных изменений рассматриваются возможные механизмы влияния ионов металла на кинетические параметры катализируемой реакции.

Материалы и методы

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и очистка КПТ. Рекомбинантная КПТ была получена клонированием гена КПТ в *E. coli* с последующей ренатурацией из телец включения и очисткой аффинной хроматографи-

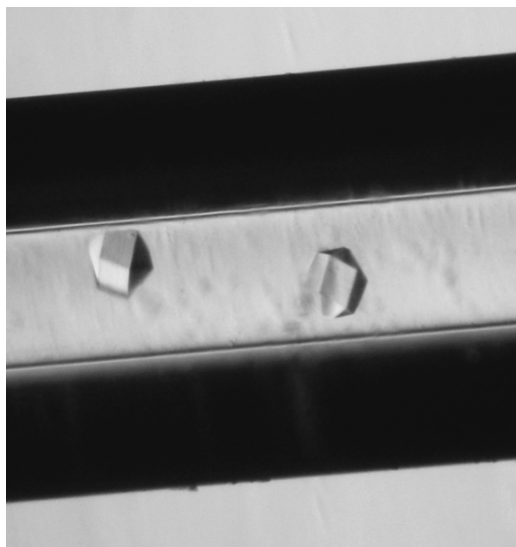


Рис. 1. Кристаллы рекомбинантной КПТ, выращенные в капилляре методом встречной диффузии.

ей на п-аминобензилянтарной кислоте, связанной с активированной сефарозой [6].

Кристаллизация КПТ. Кристаллизацию фермента проводили методом встречной диффузии в капилляре с присоединенной гелевой трубкой по методике, описанной в [7]. 10 мкл раствора белка с концентрацией 10 мг/мл в 50 мМ Mes/NaOH буфере, pH 6.0, содержащим 0.25 М NaCl, вносили

Таблица 1. Статистические характеристики дифракционного набора, собранного с кристаллов КПТ

Пр. гр.	$P6_322$
Параметры элементарной ячейки, Å, град	$a = b = 158.002, c = 103.913,$ $\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$
Диапазон разрешения, Å	30.00–1.50 (1.51–1.5)*
Количество рефлексов	7810976
Количество рефлексов на независимую часть элементарной ячейки	964318
Повторяемость	8.1 (3.6)
Расстояние кристалл – детектор, мм	185.00
Угол качания, град	0.3
Угол вращения, град	180
Полнота набора, %	98.4 (95.8)
I/σ	14.209 (2.318)
$R_{\text{sym}}(I)$, %	9.3 (41.6)
λ (длина волны излучения), Å	0.8

* В скобках указаны значения соответствующих величин в последнем слое разрешения.

в капилляр диаметром 0.5 мм. Свободный конец капилляра герметично закрывали пластилином, после чего на другой конец капилляра надевали силиконовую трубку, заполненную 1%-ным агарозным гелем, содержащим 0.04% NaN₃. Конец трубки отрезали острым лезвием до длины 10 мм. Капилляр с трубкой помещали в пробирку с закручивающейся пробкой, заполненную 1 мл раствора осадителя (1.8 М (NH₄)₂SO₄ в 50 мМ Mes/NaOH pH6.0, содержащем 3% MPD). Фотографии кристаллов КПТ в капилляре представлены на рис. 1.

Сбор и обработка дифракционных данных для кристаллов КПТ. От выращенных кристаллов при температуре 100 К собран дифракционный набор до разрешения 1.50 Å. Набор собран на синхротроне SPring-8, Япония, станция BL41XU. В качестве детектора использовался CCD-детектор MX225HE. Кристаллы перед съемкой замораживали, используя в качестве криораствора резервуарный раствор, содержащий дополнительно 20% глицерина. Дифракционные данные получены методом вращения с одного кристалла при расстоянии кристалл – детектор 185 мм, угле качания и вращения 0.3° и 180° соответственно. Длина волны составляла 0.8 Å. Обработку набора экспериментальных интенсивностей проводили с помощью программы HKL-2000 [8]. Кристаллы, принадлежащие к пр. гр. R6322, имели следующие параметры элементарной ячейки: $a = b = 158.002, c = 103.913$ Å; $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$. Статистические характеристики набора приведены в табл. 1. Количество растворителя в элементарной ячейке составило 76.01%, коэффициент Меттьюса [9] равен 5.12 Å³/Da. В независимой части ячейки содержится один мономер фермента.

Решение и уточнение структуры. Структура КПТ решена методом молекулярного замещения с использованием программы Phaser [10] и координат этого фермента при более низком разрешении в качестве стартовой модели (PDB ID : 1OBR). Для уточнения структуры использовали программу Refmac [11]. Ручную правку модели проводили при помощи программы Coot [12], используя карты электронной плотности, рассчитанные с коэффициентами $2|Fo| - |Fc|$ и $|Fo| - |Fc|$. Также в программе Coot с использованием карт электронной плотности были локализованы молекулы воды, ион цинка, ионы сульфата и молекулы глицерина. Структура при разрешении 1.69 Å была уточнена до $R_{\text{cryst}} = 16.903\%; R_{\text{free}} = 18.165\%$. Координаты модели депонированы в Международный банк белковых структур (PDB ID: 3QNV). Статистические параметры уточнения приведены в табл. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованная в данной работе пространственная структура рекомбинантной КПТ была установлена с использованием кристаллов фермента, выращенных в отсутствие ионов кальция. Ни в одном из четырех кальцийсвязывающих центров не были обнаружены ионы металла. Бескальциевая форма фермента была использована для сравнения с природной формой, которая содержит четыре связанных иона кальция [2].

Как было показано в [13], в присутствии ионов кальция существенно повышается термостабильность фермента. Ранее А.М. Гришиным и др. при исследовании кинетики гидролиза субстратов различной природы рекомбинантной КПТ было обнаружено, что присутствие ионов кальция оказывает влияние на параметры катализируемой реакции [5]. Сигмоидальный характер зависимости от концентрации ионов кальция показал, что на кинетические параметры влияют структурно связанные ионы металла. Фермент со связанными ионами кальция гидролизировал гидрофобные субстраты со скоростью в полтора раза большей и заряженные субстраты в 1.7–2.2 раза меньшей скоростью. С целью проследить возможные причины изменения активности в зависимости от присутствия ионов кальция, в данной работе было проведено сравнение пространственных структур кальцийсодержащей и бескальциевой форм фермента.

Уточненная при разрешении 1.69 Å модель рекомбинантной КПТ сравнивалась с ранее установленной структурой природного фермента. Для сравнения структур использовали наложение их по С α -атомам с помощью программы Lsqkab комплекса CCP4 [14]. Укладка полипептидной цепи и расположение функционально важных участков молекулы КПТ изображены на рис. 2. Показаны ион цинка и его окружение в каталитическом центре, некоторые аминокислотные остатки, расположенные в субстратсвязывающем центре. Черными сферами меньшего размера изображены ионы кальция. Основные найденные различия во вторичной структуре рекомбинантной и природной (1OBR) КПТ – дополнительные спиральные участки на N-конце молекулы (остатки 3–7) и в районе активного центра (остатки 144–148) в структуре без кальция – выделены темным и показаны стрелками. Детальная картина изменений вторичной структуры приведена на рис. 3.

Главное отличие полученной модели рекомбинантной КПТ от ранее установленной структуры природного фермента состоит в отсутствии ионов кальция в кальцийсвязывающих центрах, изменении конформации аминокислотных остатков, положения и числа молекул растворителя, входящих в координационную сферу (рис. 4а, 4б). Из

Таблица 2. Статистика уточнения КПТ

Разрешение, Å	10.00–1.69 (1.73–1.69)*
Количество рефлексов, использованных при уточнении	79903 (5668)
Число (5%) тестовых рефлексов	4183 (287)
Полнота набора, (%)	99.12 (98.01)
Число уточненных остатков в молекуле	323
Число уточненных атомов в белковой молекуле	2712
Количество молекул воды	265
Количество ионов сульфата	4
Количество молекул глицерина	4
<i>R</i> _{cryst} , %	16.903 (26.7)
<i>R</i> _{free} , %	18.165 (27.7)
<i>rmsd</i> длин связей, Å	0.006
<i>rmsd</i> валентных углов, град	1.006
Среднее значение температурного фактора (Å ²) для:	
атомов основной цепи	11.802
атомов боковых групп	12.111
воды	26.564
Статистика Рамачандрана распределения двугранных углов:	
в наиболее благоприятных областях, %	88.7
в разрешенных областях, %	11.4
в запрещенных областях, %	0.0

* В скобках указаны значения соответствующих величин в последнем слое разрешения.

четырех мест связывания кальция в КПТ три расположены в петле 51–61 в виде кластера на расстоянии примерно 30 Å от иона цинка в активном центре, а один ион кальция – в N-концевом участке молекулы.

В отсутствие ионов кальция в центре связывания 1 кислород главной цепи Glu-57 меняет ориентацию на противоположную, боковая группа Asp-56 поворачивается примерно на 90° и одна из молекул воды заметно меняет свое положение. В центре 2 заметно меняется положение Asp-51, Glu-57 и Glu-59, а также появляется новая молекула воды (НОН 562). В центре 3 на расстоянии 0.76 Å от связанного прежде иона кальция локализована молекула воды, а место молекулы воды, входившей прежде в координационную сферу

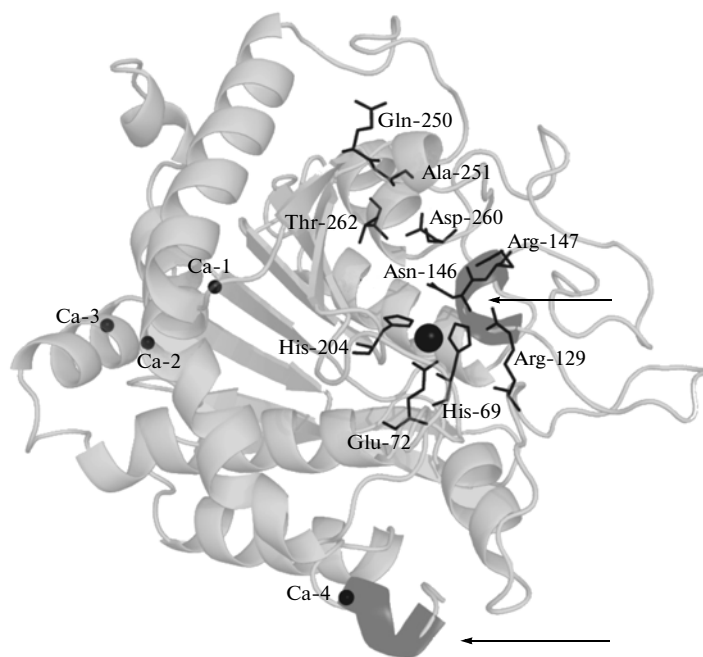


Рис. 2. Пространственная структура КПТ. Четыре сферы одинакового размера обозначают ионы кальция. Сферой большего размера показан ион цинка в активном центре. Показаны аминокислотные остатки – лиганды цинка и некоторые аминокислотные остатки в субстратсвязывающем центре. Основные найденные различия во вторичной структуре рекомбинантной и природной (PDB ID: 1OBR) КПТ выделены темным и показаны стрелками.

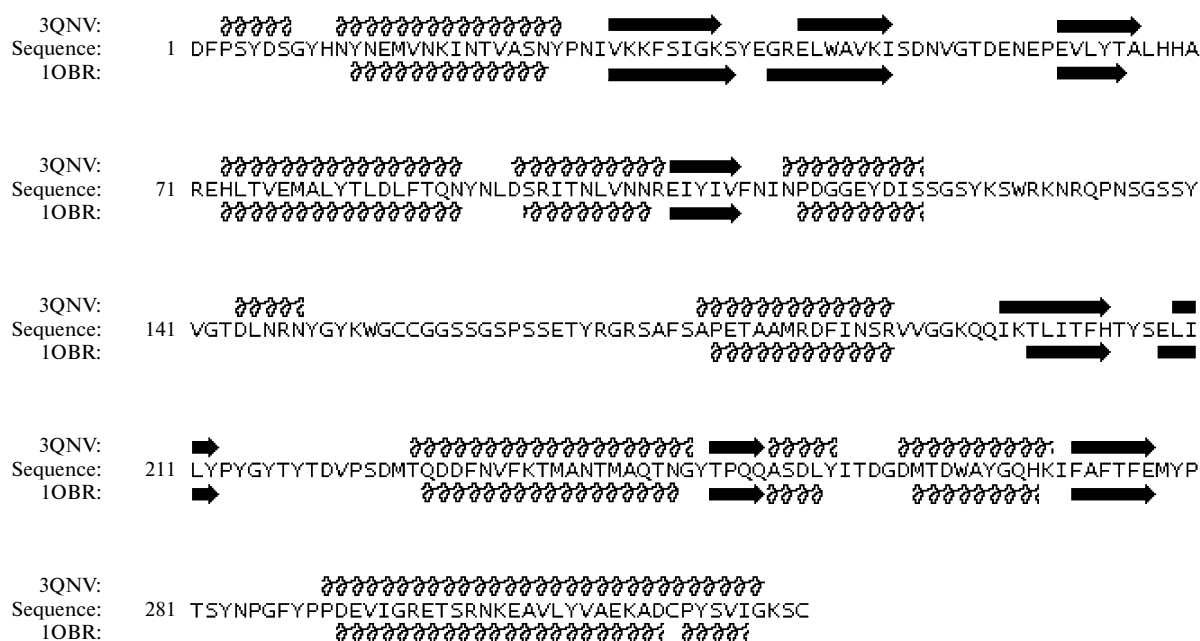


Рис. 3. Сравнение вторичной структуры природной и рекомбинантной бескальцевой КПТ.

этого иона, остается свободным (рис. 4а). Образование витка спирали на *N*-конце молекулы, происходящее после удаления иона кальция из центра 4, сопровождается небольшим сдвигом кислорода главной цепи Ser-7 и кислорода OE2 Glu-14 (рис. 4б).

Удаление связанных ионов кальция дестабилизирует трехмерную структуру КПТ, что проявляется, в частности, в уменьшении термостабильности молекулы, как было показано в [13]. Увеличение подвижности аминокислотных остатков в центрах связывания кальция после удаления иона

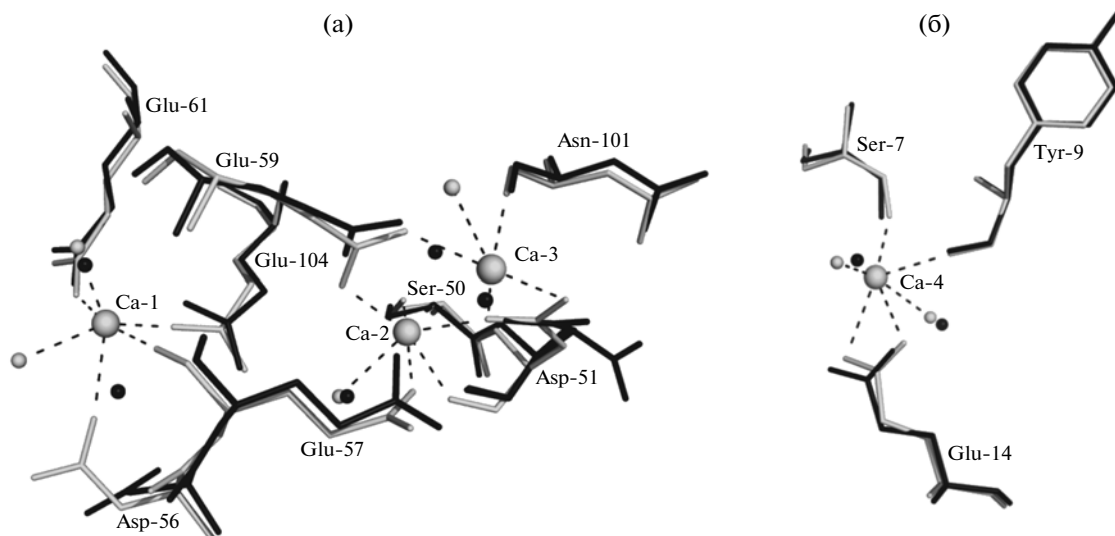


Рис. 4. Конформационные изменения в кальцийсвязывающих центрах 1, 2, 3 (а) и 4 (б) природной (светло-серый цвет) и рекомбинантной (черный цвет) КПТ. Сферами большего диаметра обозначены ионы кальция, а сферами меньшего диаметра – молекулы воды. Пунктирные линии связывают ионы кальция и лиганды в его координационной сфере.

подтверждается и сопоставлением отношений средней величины В-фактора для аминокислотных остатков кальций-связывающих центров к среднему В-фактору в структурах с кальцием и без кальция: это отношение равно 0.684 для структуры с кальцием и 0.593 для структуры без кальция, что говорит об увеличении среднего В-фактора остатков ближайшего окружения кальция по отношению к среднему В-фактору в структуре без кальция.

Наряду с изменениями в кальцийсвязывающих центрах фермента, в отсутствие кальция некоторые конформационные сдвиги происходят и непосредственно в полости активного центра (рис. 5). В структуре рекомбинантной бескальциевой КПТ в области активного центра локализовано дополнительно три молекулы воды (НОН-369, НОН-499, НОН-568). Молекула 568 появляется вблизи кислорода OE1 Gln-250, что сопровождается смещением боковой цепи этого остатка (кислород OE1 смещается на 2.89 Å). Молекула 369 находится на расстоянии водородной связи от этого остатка. Еще одна новая молекула локализована на расстоянии 2.68 Å от кислорода главной цепи Ala-251, 3.2 Å – от кислорода главной цепи Tyr-255 и 2.56 Å – от O3 глицерина 329, который, по-видимому, появился в активном центре в результате погружения кристалла в криораствор. Следует отметить, что молекула глицерина имеет низкую заселенность и высокий В-фактор. Появление этой молекулы воды сопровождается смещением кислорода главной цепи Ala-251 на 0.48 Å.

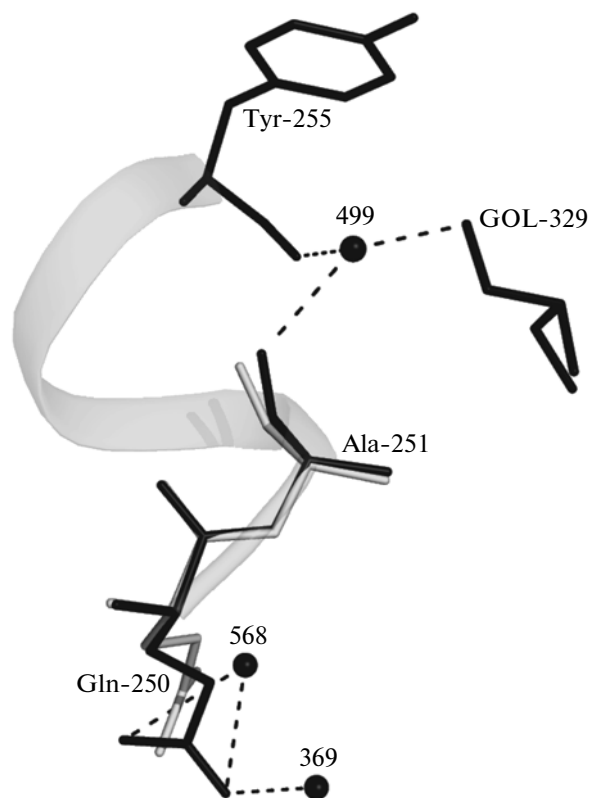


Рис. 5. Конформационные изменения в полости активного центра природной (светло-серый цвет) и рекомбинантной (черный цвет) КПТ. Черными сферами показаны молекулы воды, локализованные в активном центре рекомбинантной КПТ. GOL-329 – молекула глицерина 329.

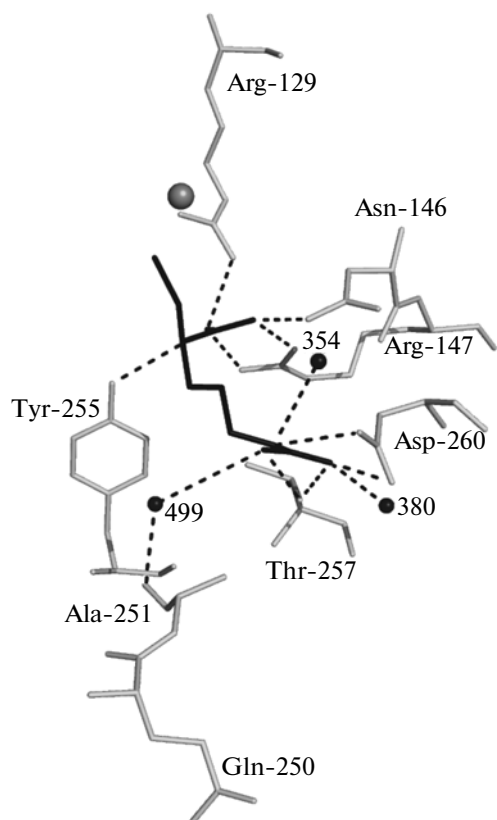


Рис. 6. Положение ингибитора – 5-гуанидино-2-меркаптометил-пентановой кислоты (черный цвет), помещенного в активный центр КПТ в результате совмещения структур рекомбинантной КПТ и КПВ с лигандом (PDB ID: 3ZG9). Черными сферами показано положение молекул воды, локализованных в полости активного центра вблизи ингибитора.

Чтобы выяснить возможную функциональную роль обнаруженных в активном центре молекул воды, было проведено совмещение структур бескальциевой КПТ и структуры КПВ с ингибитором, ковалентно связанным с ионом цинка активного центра (PDB ID: 1ZG9). Совмещение структур проводили по $C\alpha$ – атомам 17-ти гомологичных аминокислотных остатков активного центра с помощью программы Lsqkab комплекса CCP4 [14]. Положение ингибитора, помещенного в активный центр КПТ, показано на рис. 6. Оказалось, что молекула воды 499 расположена вблизи гуанидиновой группы ингибитора (рис. 7), в кармане первичной специфичности КПТ [6, 15]. Все найденные молекулы воды расположены в центре первичной специфичности фермента и одна из них (499) может непосредственно взаимодействовать с субстратом.

Появление дополнительных молекул воды и дополнительных водородных связей в полости активного центра, согласно [16], может оказывать

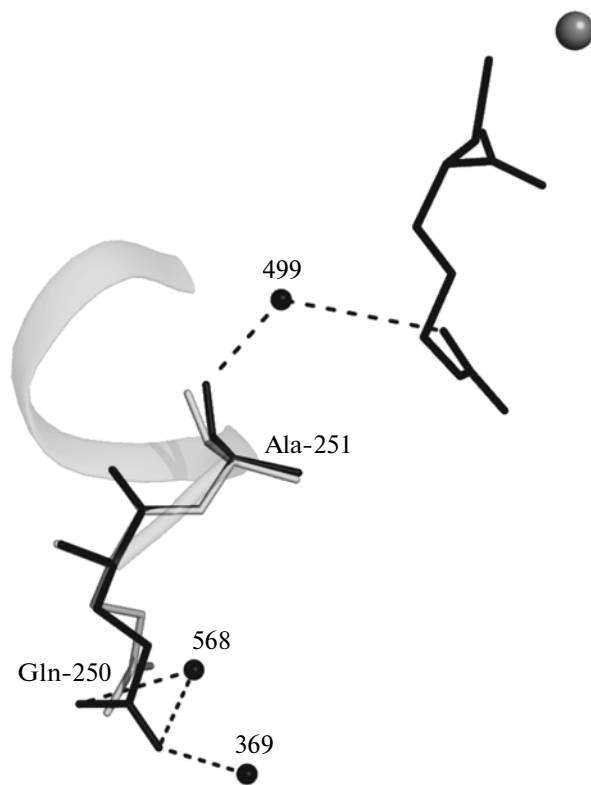


Рис. 7. Конформационные сдвиги аминокислотных остатков Gln-250 и Ala-251 в субстратсвязывающем центре природной (светло-серый цвет) и рекомбинантной (черный цвет) КПТ. В правом верхнем углу около иона цинка (серая сфера) показано положение ингибитора (черный цвет), помещенного в активный центр КПТ в результате совмещения структур рекомбинантной и природной КПТ и КПВ с лигандом (PDB ID : 3ZG9). Молекулы воды изображены черными сферами.

влияние на прочность связывания субстрата в активном центре, что будет отражаться и на скорости гидролиза. Полученные в данной работе результаты объясняют обнаруженное ранее влияние ионов кальция на катализ ферментом и позволяют рассматривать ионы кальция как отдаленные детерминанты специфичности фермента, что было ранее предположено в [5].

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smulevitch S.V., Osterman A.L., Galperina O.V. et al. // FEBS Lett. 1991. V. 291. P. 75.
2. Teplyakov A., Polyakov K., Obmolova G. et al. // Eur. J. Biochem. 1992 V. 208. P. 281.
3. Perona J.J., Craik C. S. // Protein Sci. 1995. V. 4. P. 337.

4. *Jelinek B., Antal J., Venekei I., Gráf L.* // PEDS. V. 17. P. 127.
5. *Гришин А.М., Акпаров В.Х., Честухина Г.Г.* // Биохимия. 2008. Т. 73. С. 1422.
6. *Акпаров В.Х., Гришин А.М., Юсупова М.П. и др.* // Биохимия. 2007. Т. 72. С. 515.
7. *Tanaka H., Inaka K., Sugiyama Sh. et al.* // J. Synchrotron Rad. 2004. V. 11. P. 45.
8. *Otwinowski Z., Minor W.* // Methods in Enzymol. 1997. V. 276. P. 307.
9. *Matthews B.W.* // J. Mol. Biol. 1968. V. 33. P. 491.
10. *McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Storoni L.C. et al.* // Acta Cryst. 2005. V. D61. P. 458.
11. *Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J.* // Acta Cryst. 1997. V. 53. P. 240.
12. *Emsley P., Cowtan K.* // Acta Cryst. D. 2004. V. 60. P. 2126.
13. *Osterman A.L., Stepanov V.M., Rudenskaya G.N. et al.* // Biokhimiya 1984. V. 49. С. 292.
14. COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, NUMBER 4 // Acta Cryst. D. 1994. V. 50. P. 760.
15. *Акпаров В.Х., Гришин А.М., Тимофеев В.И., Куранова И.П.* // Кристаллография. 2010. Т. 55. С. 851.
16. *Fersht A.R., Shi J.P., Knill-Jones J.* // Nature. 1985. V. 314. № 6008. P. 235.