

УДК 577.152.342

ПОДВИЖНАЯ ПЕТЛЯ АКТИВНОГО ЦЕНТРА – НЕДООЦЕНЕННАЯ СТРУКТУРНАЯ ДЕТЕРМИНАНТА СУБСТРАТНОЙ СЕЛЕКТИВНОСТИ МЕТАЛЛОКАРБОКСИПЕПТИДАЗ^{*,**}

© 2019 В.Х. Акпаров^{1***}, В.И. Тимофеев^{2,3}, И.Г. Халиуллин⁴,
Г.Е. Константинова¹, И.П. Куранова^{2,3}, Т.В. Ракитина^{3,5}, В.К. Швядас⁶

¹ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545 Москва, Россия; электронная почта: valery.akparov@yandex.ru

² Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, 119333 Москва, Россия; электронная почта: tostars@mail.ru

³ НИЦ «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия;
электронная почта: taniarakitina@yahoo.com

⁴ Московский физико-технический институт (государственный университет), Россия 141700, Московская область, Долгопрудный, Россия; электронная почта: khig@mail.ru

⁵ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия; электронная почта: taniarakitina@yahoo.com

⁶ Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: vyta@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 05.06.2018

После доработки 19.09.18

Принята к публикации 19.09.18

Принято считать, что первичную субстратную специфичность металлокарбокисептидаз определяет строение кармана первичной специфичности. Однако мутант карбокисептидазы Т из *Thermoactinomyces vulgaris*, в котором, благодаря заменам G215S, A251G, T257A, D260G, T262D, был полностью воспроизведен карман первичной специфичности панкреатической карбокисептидазы В, сохранил присущую ферменту дикого типа каталитическую активность и широкую, преимущественно гидрофобную специфичность. С целью выяснения факторов, влияющих на субстратную специфичность металлокарбокисептидаз, и причин расхождения со сложившимися представлениями нами была определена структура комплекса мутанта карбокисептидазы Т с заменами G215S, A251G, T257A, D260G и T262D с аналогом переходного состояния N-сульфамойл-L-фенилаланином с разрешением 1,35 Å и проведено ее сравнение со структурой аналогичного комплекса, образованного карбокисептидазой В. Сравнительное исследование позволило выявить ранее недооцененную структурную детерминанту субстратной специфичности металлокарбокисептидаз и показало, что при мутации пяти аминокислотных остатков (а.о.) в кармане первичной специфичности карбокисептидазы Т удастся добиться практически полного структурного соответствия аналогичному карману в карбокисептидазе В, однако это не приводит к принципиальному изменению субстратной специфичности мутанта из-за различий в строении подвижной петли, расположенной у входа в активный центр карбокисептидаз и влияющей на индуцируемую субстратом конформационную перестройку этого центра.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: металлокарбокисептидаза Т, *Thermoactinomyces vulgaris*, металлокарбокисептидаза В, S1'-субсайт, субстратная специфичность, N-сульфамойл-L-фенилаланин, рентгеноструктурный анализ.

DOI: 10.1134/S0320972519010044

Геном человека содержит структурные гены ~600 протеаз, в т.ч. ~150 цинк-зависимых металлоферментов, которые вовлечены в целый ряд

важных физиологических и патологических процессов, включая иммунный ответ, воспаление, клеточную гибель, пролиферацию, физио-

Принятые сокращения: а.о. – аминокислотные остатки; КПТ – карбокисептидаза Т из *Thermoactinomyces vulgaris*; КПВ – панкреатическая карбокисептидаза В свиньи; SPhe – N-сульфамойл-L-фенилаланин; КПТ5 – мутант КПТ с заменами A243G, T250A, A253G, D260G, T262D; КПТwt – карбокисептидаза Т дикого типа; ZAAL – N-бензилоксикарбонил-L-аланил-L-аланил-L-лейцин.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM18-165, 12.11.2018.

** Статья на английском языке опубликована в томе 83, вып. 12, 2018.

*** Адресат для корреспонденции.

логический гомеостаз, онкологические изменения, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные патологии, инфекционные заболевания [1–3]. Металлокарбоксипептидазы, отщепляющие С-концевые аминокислотные остатки (а.о.) в белках и полипептидах, являются широко известными экзопептидазами, роль которых первоначально представлялась ограниченной катаболизмом, а в случае панкреатических карбоксипептидаз А и В (КПА и КПВ) — пищеварением. Однако, в результате анализа геномной информации и биохимических исследований было показано, что участие металлокарбоксипептидаз в функционировании живых систем существенно шире [4, 5]. С открытием все новых свидетельств о важной роли протеаз в живых системах наблюдается возрастающий интерес к пониманию тонких деталей механизма действия этих металлопротеаз, их субстратной специфичности и регуляции каталитической активности.

Карбоксипептидаза Т из *Thermoactinomyces vulgaris* (КПТ, ЕС 3.4.17.18) относится к группе цинк-зависимых микробных карбоксипептидаз. Она является отдаленным гомологом КПА и КПВ, имея <30% идентичных с ними остатков [6]. Полипептидная цепь зрелой КПТ состоит из 326 а.о. Укладка полипептидной цепи КПТ такая же, как у карбоксипептидаз млекопитающих, и является типичной для α/β -доменных гидролаз. Структура состоит из β -листов, образованных восемью β -тяжами, окруженными шестью α -спиралями [7].

Активный центр КПТ расположен у центральной части β -листов (рис. 1) и содержит каталитические остатки и участки связывания боковых групп а.о. субстрата. Участок связывания С-концевой карбоксильной группы и боковой группы отщепляемого аминокислотного остатка принято называть «карманом первичной специфичности», или S1'-субсайтом по номенклатуре Schechter и Berger [8]. К началу 2000-х гг. под влиянием работ Vallee et al. [9], Lipscomb et al. [10], Gardell et al. [11], Степанова [12] и Остермана [7, 13] сложилось представление, что субстратная специфичность металлокарбоксипептидаз в отношении отщепляемой аминокислоты определяется природой семи остатков, формирующих S1'-субсайт (нумерация по КПВ/КПТ): Leu203/Leu211, Ser207/Gly215, Gly243/Ala251, Ala250/Thr257, Gly253/Asp260, Asp255/Thr262, Thr268,275), среди которых главная роль принадлежит остатку на дне кармана первичной специфичности [11, 13, 14]. В КПА таким а.о. служит Ile255 с гидрофобной боковой цепью, и, соответственно, КПА отщепляет гидрофобные С-концевые аминокислоты. В КПВ и карбоксипептидазе U [15] в положении 255 находится

Asp, и эти ферменты с высокой селективностью гидролизуют субстраты, содержащие С-концевые аминокислоты с положительно заряженным боковым радикалом. В карбоксипептидазе O (КПО) в положении 255 расположен остаток Arg [16], и фермент отщепляет отрицательно заряженные С-концевые остатки.

Заменой Asp255 на остаток Arg удалось превратить КПВ в КПО-подобный фермент [17], что, казалось, окончательно подтвердило постулат об определяющей роли этого остатка в распознавании субстратов металлокарбоксипептидазами. Тем не менее при расширении круга исследуемых металлокарбоксипептидаз стало понятно, что существуют и другие факторы, влияющие на первичную специфичность в этом семействе ферментов. Так, например, спектр расщепляемых субстратов зависит и от природы остатка в соседнем к остатку 255 положении: в КПТ дикого типа (КПТwt) в положении 260 (253 по КПА) расположен остаток Asp, и фермент способен отщеплять как гидрофобные, так и положительно заряженные С-концевые остатки, хотя и в 10 раз менее эффективно [12]. В распознавании субстратов металлокарбоксипептидазами могут участвовать не только непосредственно контактирующие с отщепляемым остатком, но и удаленные фрагменты структуры фермента.

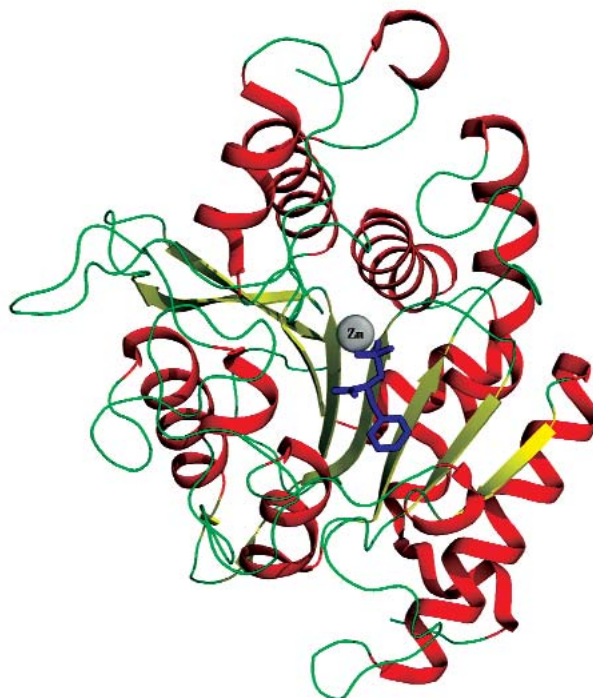


Рис. 1. Трехмерная структура КПТ5. SPhе показан в стержневом виде, ион цинка — в виде сферы. С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

Так, нами ранее было обнаружено влияние структурных ионов кальция на субстратную специфичность КПТ [18].

Карман первичной специфичности КПТwt пространственно подобен таковому в КПВ, а также КПА [7] и отличается от кармана первичной специфичности КПВ пятью заменами. Введение соответствующих мутаций G215S, A251G, T257A, D260G и T262D, реконструирующих в КПТ карман первичной специфичности КПВ с учетом имеющихся знаний, должно было если не превратить гидрофобно-селективную КПТ в КПВ-подобный фермент, то хотя бы увеличить ее способность отщеплять положительно заряженные остатки с С-конца субстратов. На деле этого не произошло, и КПТ5 с реконструированным S1'-субсайтом КПВ не только сохранила гидрофобную субстратную специфичность, но и снизила способность превращать субстраты с положительно заряженным С-концевым остатком [19]. Эти результаты указали на то, что специфичность металлокарбокситепептидаз по отщепляемому а.о. определяется не только его комплементарностью к S1'-субсайту, но и другими, возможно, превосходящими по своему влиянию структурными факторами.

С целью выяснения таких структурных детерминант, определяющих субстратную специфичность металлокарбокситепептидаз, а также причин расхождения со сложившимися представлениями о роли а.о. кармана первичной специфичности ферментов этого семейства, нами была определена с высоким разрешением трехмерная структура комплекса мутанта КПТ с заменами G215S, A251G, T257A, D260G и T262D (КПТ5) с аналогом переходного состояния N-сульфамоил-L-фенилаланином (SPhe), и проведено ее сравнение со структурой аналогичных комплексов, образованных КПВ и КПА. Это сопоставление позволило выявить ранее недооцененную структурную детерминанту субстратной специфичности металлокарбокситепептидаз.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. Для кристаллизации КПТ использовали стеклянные капилляры фирмы «Confocal Science Inc.» длиной 60 мм и внутренним диаметром 0,5 мм. В работе использовали деионизованную воду MilliQ («Миллипор», США) с сопротивлением 19 МОм/см, мембраны для ультрафильтрации YM10 и ультрафильтрационные ячейки фирмы Амикон (США), патроны для микрофильтрации Centripack («Миллипор», США). 2-Метил-2,4-пентандиол (MPD), L-цистин и L-цистеин, диизопропилфторфосфат,

изопропил-β-D-тиогактопиранозид (IPTG), 3-[(3-холамидопропил)диметиламино]-1-пропансульфонат (CHAPS), моногидрат 4-морфолиноэтансульфоновой кислоты (MES) – препараты фирмы «Сигма» (США). Субтилизин 72 выделяли из Протосубтилиина Г10х производства Ладыжинского завода био- и ферментных препаратов (Украина) по описанной ранее методике [20].

Хромогенный субстрат *p*-нитроанилид карбобензоксид-L-аланил-L-аланил-L-лейцина (ZAALpNA) для определения активности субтилизина и субстрат карбобензоксид-L-аланил-L-аланил-L-лейцин (ZAAL) для определения активности КПТ были синтезированы в лаборатории химии белка ГосНИИгенетики ранее [21]. Аффинный сорбент *p*-аминобензилсукцинил-Сефароза-4В (CABS-Сефароза) был приготовлен как описано в литературе [22]. SPhe был получен из ООО ИНЦ «Солярис».

Мутантный вариант гена *pro-cpT5* был получен из ООО «Евроген», Россия. Наличие мутаций было подтверждено секвенированием.

Получение рекомбинантной КПТ. Экспрессию гена *pro-cpT5* проводили в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS (Novagene) согласно инструкции производителя [23]. После индукции экспрессии с помощью изопропил-β-D-тиогактопиранозид (IPTG) клетки разрушали ультразвуком.

Выделение проКПТ из телец включения проводили, как описано ранее [24]. Для получения зрелого фермента к раствору проКПТ5 добавляли субтилизин 72 в соотношении КПТ к субтилизину 200 : 1 (по весу) и инкубировали 4 ч при 37 °С. Субтилизин инактивировали добавлением диизопропилфторфосфата. Раствор с активированной КПТ снова концентрировали ультрафильтрацией до объема 2 мл и центрифугировали для удаления осадка.

После концентрирования раствор фермента подкисляли до pH 6,0, прибавляя 100 мМ MES/NaOH, pH 5,8, наносили на колонку с CABS-Сефарозой (объем колонки 20 мл), уравновешенную 10 мМ буфером MES/NaOH, pH 6,0, содержащим 0,5 М NaCl, 10 мМ CaCl₂ и 0,1 мМ ZnSO₄, промывали колонку этим же буфером и затем элюировали КПТ5 10 мМ буфером Tris-HCl, pH 9,0. Фракции, содержавшие активный белок, объединяли, концентрировали до 1 мл, проводили замену буфера на буфер для кристаллизации (0,01 М MES/NaOH pH 6,0, содержащий 1 мМ CaCl₂, 0,1 мМ ZnSO₄, 5% MPD и 0,25 М NaCl) трехкратным концентрированием/разбавлением в 10 раз ультрафильтрацией на ячейке Амикон, затем концентрировали белок до 10 мг/мл по Брэдфорд [25] и стерильно фильтровали с помощью

центрифужных патронов Centrifask. Далее этот раствор использовали для кристаллизации белка. Отсутствие субтилизиновой активности было подтверждено с помощью специфического хромогенного субстрата ZAALpNA. Ds-Na-ПААГ-электрофорез проводили согласно Лэммли [26].

Кинетические исследования. Кинетические эксперименты проводили при 25 °С в термостатируемой кварцевой кювете объемом 1 мл с оптическим путем 1 см. Раствор субстрата (0,5 мл) в 0,25 М буфере Tris-HCl, pH 7,5, содержащем 0,01 М CaCl₂, термостатировали в течение 5 мин и начинали реакцию добавлением 2–5 мкл раствора фермента. За протеканием реакции следили на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 при 225 нм.

Определение констант ингибирования. Интегральные кинетические кривые катализируемого КПТ5 гидролиза субстрата ZAAL в присутствии и в отсутствие ингибитора SPhe анализировали в координатах:

$$\frac{t}{\ln(s_0/s)} \text{ versus } \frac{s_0 - s}{\ln(s_0/s)} \quad [27],$$

где t – время, s и s_0 – текущая и начальная концентрация субстрата. Это позволяло определить значения кажущейся величины $(K_M/V_{\max})_{\text{app}}$ при каждой используемой концентрации ингибитора (I). Для нахождения величины константы ингибирования (K_I) анализировали зависимость определенного таким образом параметра $(K_M/V_{\max})_{\text{app}}$ от концентрации ингибитора в соответствии с линейным уравнением:

$$\left(\frac{K_M}{V_{\max}} \right)_{\text{app}} = \left(\frac{K_M}{V_{\max}} \right)_0 \left(1 + \frac{I}{K_I} \right).$$

Площадь контактной поверхности. Вычисления поверхностей контактов а.о. (buried surface area, BSA) в активном центре фермента проводили с использованием программы Pisa, размещенной на сервере Европейского института биоинформатики (http://www.ebi.ac.uk/pdbe/prot_int/pistart.html) [28].

Кристаллизация белка. Кристаллы комплекса КПТ5 с SPhe были выращены в условиях микрогравитации с использованием метода встречной диффузии в капилляре через слой геля (табл. 1), при этом применяли оборудование и технологию, разработанные Аэрокосмическим агентством Японии (JAXA) [29, 30]. В капилляр диаметром 0,5 мм вносили 8 мкл раствора белка, приготовленного, как описано выше. Свободный конец капилляра герметично закрывали пластилином, на другой конец капилляра надевали силиконовую трубку, заполненную 1%-ным ага-

розным гелем, предварительно вымоченную в растворе осадителя в течение суток. Трубку с гелем укорачивали до 10 мм. Капилляр с трубкой помещали в цилиндр с осадителем, который представлял собой 1,6 М раствор сульфата аммония в 10 мМ буфере MES/NaOH, pH 6,0, содержащим 0,5 М NaCl, 10 мМ CaCl₂, 0,1 мМ ZnSO₄ и 100 мМ SPhe. Несколько устройств в специальной упаковке доставляли на Международную космическую станцию, где кристаллизация проходила при 20 °С. Кристаллы для сбора дифракционных данных извлекали из капилляра в раствор осадителя и после перенесения в

Таблица 1. Статистические характеристики набора и уточнения структуры КПТ5 в комплексе с SPhe

<i>Обработка набора</i>	
Пространственная группа	P6(3)22
$a = b, c, A; \alpha = \beta, \gamma$, град	157,7, 104,4; 90, 120
Разрешение, Å	10,0–1,35 (1,384–1,350)*
Количество независимых рефлексов	165 917
Полнота, %	99,65 (99,92)
$I/\sigma(I)$	24,42 (3,78)
Rmrgd-F, %	10,2 (29,7)
<i>Уточнение</i>	
Разрешение, Å	10,0–1,35 (1,384–1,350)
Количество рефлексов	157 224 (11 354)
Rcryst, %	13,9
Rfree, %	15,4
Количество уточненных атомов	2577
Количество уточненных молекул воды	254
Средний B-фактор, Å ²	15,0
<i>RMS</i>	
По длинам связей, Å	0,006
По углам, град	1,213
<i>Карта Рамачандрана</i>	
Наиболее благоприятные области, %	99,0
Допустимые области, %	1,0
Запрещенные области, %	0,0

* В скобках приведены значения для последней оболочки.

криораствор замораживали в парах жидкого азота. Кроме компонентов осадителя криораствор содержал 20% глицерина (по весу).

Сбор и обработка дифракционных данных для кристаллов КПТ5. На выращенных кристаллах был собран дифракционный набор до разрешения 1,35 Å при температуре 100 К на синхротроне SPring-8 (Япония, станция BL41XU). В качестве детектора использовали MARMOSAIC 225 MM CCD. Дифракционные данные получали методом вращения одного кристалла при расстоянии между кристаллом и детектором 100 мм и длине волны 0,8 Å; углы качания и вращения составили $-0,5^\circ$ и 180° соответственно. Обработку набора экспериментальных интенсивностей проводили с помощью программы iMosflm [6]. Кристаллы относятся к пространственной группе $P6(3)22$. В независимой части ячейки содержится одна молекула фермента.

Решение и уточнение структуры. Структура КПТ5 в комплексе с SPhe была решена методом молекулярного замещения с использованием программы Phaser [31] и координат этого фермента в свободном состоянии в качестве стартовой модели (PDB ID : 4IHM). Для уточнения структуры использовали программу Refmac [32]. Ручную правку модели проводили при помощи программы Coot [33], 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, молекулы глицерина и SPhe. Структура при разрешении 1,35 Å была уточнена до $R_{cryst} = 13,9\%$; $R_{free} = 15,4\%$. Координаты модели депонированы в Международном банке белковых структур (PDB ID : 4IAV). Статистические параметры уточнения приведены в табл. 1. Для сравнения структур использовали наложение их по α -атомам с помощью программы Lsqkab комплекса CCP4 [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кристаллическая структура комплекса КПТ5 с SPhe была получена с высоким разрешением (1,35 Å) благодаря эффективной очистке фермента при помощи аффинной хроматографии, высокому качеству кристаллов, полученных в условиях микрогравитации, а также использованию самого мощного в мире синхротрона SPring-8 (Япония, станция BL41XU) в рамках программы российско-японского сотрудничества в космосе (Космический эксперимент «кристаллизатор»). В активном центре полученной структуры обнаружена электронная плот-

ность, которая была идентифицирована как молекула SPhe (рис. 2).

Сульфамойльный остаток расположен рядом с ионом цинка и находится в асимметричной тетраэдрической конфигурации со связью между атомами азота и цинка, типичной для сульфамойльных аналогов переходного состояния [34, 35]. Остаток Tyr255 (как и Tyr248 в КПВ в комплексе с SPhe), участвующий в индуцируемом субстратом конформационном изменении активного центра фермента, находится в так называемом «нижнем» положении, в котором он перекрывает доступ воды в каталитический центр и образует водородную связь с С-концевой карбоксильной группой лиганда. «Верхнее» положение остатка Tyr255 характерно для карбоксипептидазы со свободным активным центром, при этом гидроксильная группа тирозина смещена на 12 Å от «нижнего» положения. Для перехода из «верхнего» положения Tyr255 в «нижнее» достаточно присутствия в зоне связывания С-концевой карбоксильной группы ионов сульфата или ацетата [36]. Значимых различий в положении α -углеродных атомов активного центра в КПТ5 и КПТwt не наблюдали, что подтверждает предположение об отсутствии нарушений структуры белка при введении мутаций, высказанное на основании данных о каталитической активности мутанта.

Сравнение структуры комплекса КПТ5-SPhe с ранее установленной структурой КПВ в анало-

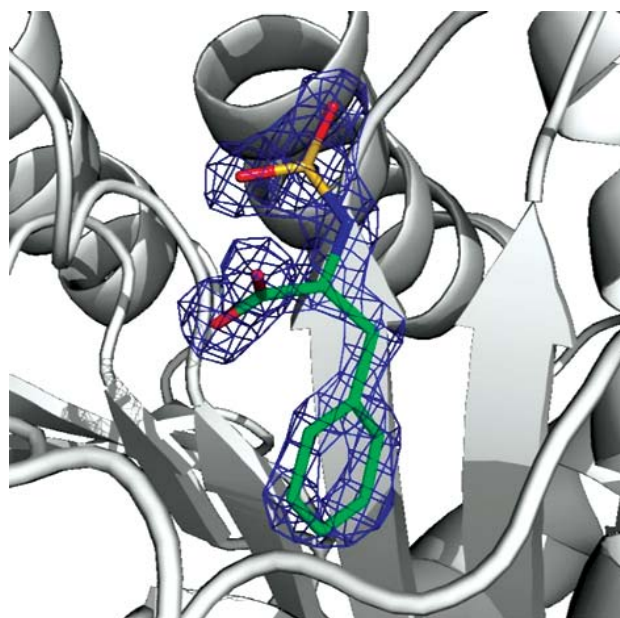


Рис. 2. Электронная плотность SPhe, вычисленная с помощью коэффициента $|Fo| - |Fc|$ на уровне 2,0. Лиганд был исключен из карты электронной плотности. С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

гичном комплексе (5J1Q) [37] показало, что среднеквадратичное отклонение (СКО) атомов цинка и α -углеродных атомов каталитического центра КПТ5 (His69, Glu72, His204, Arg129, Glu277, Asn146, Arg147 и Tyr255) и соответствующих атомов КПВ составило 0,41 Å. При исключении остатка Tyr255, расположенного на подвижной петле у входа в активный центр, отклонение составило 0,24 Å. Отклонение остатков атомов S1'-субсайтов (211/203, 215/207, 251/243, 257/250, 260/253, 262/255 и 275/268; нумерация по КПТ/КПВ) равно 0,30 Å. Таким образом, мутант КПТ5 не претерпел нарушения пространственной структуры S1'-субсайта и сохранил ее подобие S1'-субсайту КПВ. Наибольшее отклонение (0,41 Å) имеет остаток Asp262 из-за его двойного положения (положения А и В, рис. 3), причем заселенность положения А, совпадающего с положением Asp255 КПВ, составляет 90%. Это связано с тем, что в положении А боковая цепь Asp262 по данным программы Pisa имеет две водородные связи (с Asp263 и Thr275) и контакты с Ser215, Gly260 и Thr275, тогда как в положении В она имеет только одну водородную связь с Thr275 (рис. 3).

Отметим, что в КПВ карбоксильная группа Asp262 в конформации В встречает стерические затруднения (расстояние 2,78 Å) со стороны бензольного ядра Tyr192, отсутствующего в КПТ, и поэтому конформация В не реализуется. Представляется маловероятным, что эти различия могут быть причиной лучшего связывания гидрофобных лигандов КПТ5 по сравнению с КПВ.

Атом серы SPhe (соответствует sp^3 -гибризованному атому углерода переходного состояния) в комплексе с КПТ5 смещен на 0,3 Å относительно атома серы в комплексе КПВ. Фенольный кислород Tyr255, связанный с карбоксильными группами лигандов водородной связью, смещен на 0,6 Å, атомы цинка смещены на 0,1 Å. Различие в расстоянии атомов серы от ионов цинка может отражать разную стабильность соответствующих переходных комплексов и, соответственно, разную каталитическую активность КПТ5 и КПВ по гидрофобным субстратам.

Наложение S1'-субсайтов КПТ5 и КПВ показало, что боковая цепь лиганда связывается с этими двумя ферментами в разной конформации. Соответственно, различаются и взаимодействия с ферментом. В случае КПТ5 ароматический цикл SPhe располагается параллельно ароматическому кольцу Tyr255 и, по-видимому, вступает с ним в π - π -взаимодействие. Кроме того, боковой радикал SPhe имеет гидрофобные контакты с Leu211, Gly251, Leu254, Ala257 и Thr275 (рис. 4).

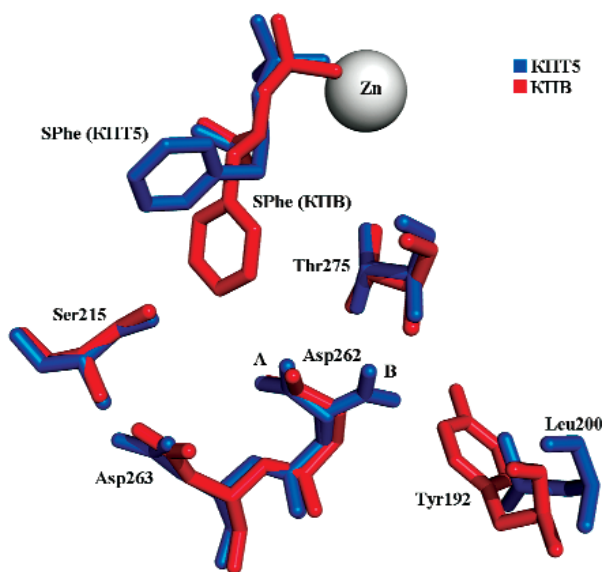


Рис. 3. Расположение Asp262 и окружающих а.о. фермента в конформациях А и В. Нумерация по КПТ (кроме Tyr192). С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

Гидрофобное окружение боковой группы лиганда обеспечивает высокую эффективность превращения гидрофобных субстратов и связывание гидрофобного ингибитора мутантом КПТ5 (табл. 2). В то же время ароматический цикл боковой группы SPhe в комплексе с КПВ направлен в сторону Asp255 и располагается в гидрофильном окружении боковой карбоксильной группы Asp255 и гидроксильных групп Ser207 и Thr268, а также карбонильной группы

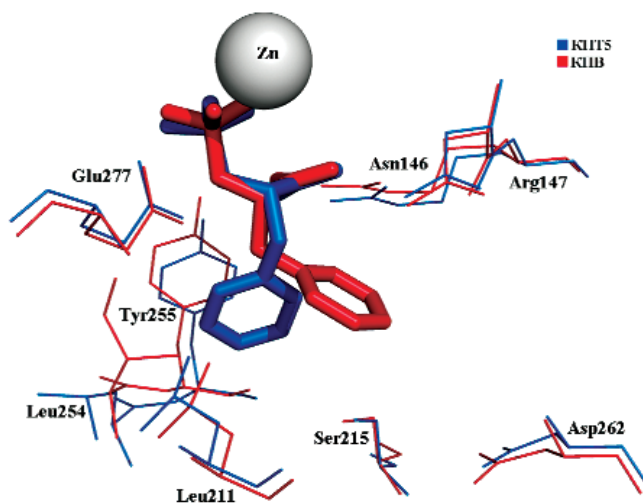


Рис. 4. Расположение SPhe в активных центрах КПТ5 и КПВ. Кроме лигандов и иона цинка изображены остатки L211/203, S215/207, G251/243, L254/247, Y255/248, G260/253, D262/255, A257/250 и T275/268 (нумерация КПТ/КПВ). С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

Таблица 2. Кинетические параметры гидролиза гидрофобного субстрата ZAAL и константа ингибирования аналогом переходного состояния реакции SPhe

Фермент	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , мМ	K_i , мкМ
КПВ	$5,0 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,1$	146 ± 5 [37]
КПТwt	$6,0 \pm 0,3$	$0,027 \pm 0,006$	35 ± 4 [38]
КПТ5	23 ± 4 [19]	$0,15 \pm 0,01$ [19]	110 ± 20

Ala250 основной цепи (рис. 4). Большую по сравнению с КПТ5 площадь гидрофобных контактов с лигандом у КПВ имеют только метиленовая группа Gly253/260 и боковая группа Ile247/254 (рис. 5). Невыгодность такого окружения для связывания гидрофобного аналога переходного состояния определяет низкую эффективность превращения КПВ гидрофобных субстратов с объемистыми боковыми цепями (табл. 2).

Таким образом, конформация SPhe и его взаимодействия в комплексе с КПТwt [38] иные, чем в КПТ5 и КПВ, что связано с влиянием пяти замен, отличающих КПТwt от КПВ. По какой причине боковая цепь SPhe в комплексе с КПТ5 может располагаться в гидрофобном субсайте, образованном Tyr255, Leu211, Leu254,

Ala257, а боковая цепь того же лиганда в комплексе с КПВ вынуждена находиться в гидрофильном окружении сайта связывания боковой цепи Arg, если соответствующие остатки, формирующие S1'-субсайты, хорошо совмещаются? При сравнении поверхностей S1'-субсайтов КПВ и КПТ5 видно, что S1'-субсайт КПТ5 имеет, по сравнению с КПВ, дополнительный свободный участок в районе, прилегающем к подвижной петле активного центра (рис. 6). Этот участок в КПТ5 занят лигандом, а в КПВ – остатком Ile247, который не позволяет боковой группе лиганда переместиться на это место из своего гидрофильного окружения. Остаток Ile247 играет важную, до сих пор недооцененную роль в субстратной специфичности металлокарбоксипептидаз. Перемещаясь вместе с остатком Tyr248 в «нижнее» положение в КПВ, он закрывает S1'-субсайт от воды, что уменьшает диэлектрическую проницаемость и усиливает ионное взаимодействие Asp255 с положительно заряженным субстратом. В случае КПА Ile247 в «нижнем» положении увеличивает гидрофобность S1'-субсайта и гидрофобную селективность КПА, содержащего Ile255, а также Ile243. Неспособность Leu254 в «нижнем» положении изолировать S1'-субсайт КПТ от воды и фиксировать лиганд в суженной зоне связывания приводит к тому, что субстрат может занимать как положение, сбли-

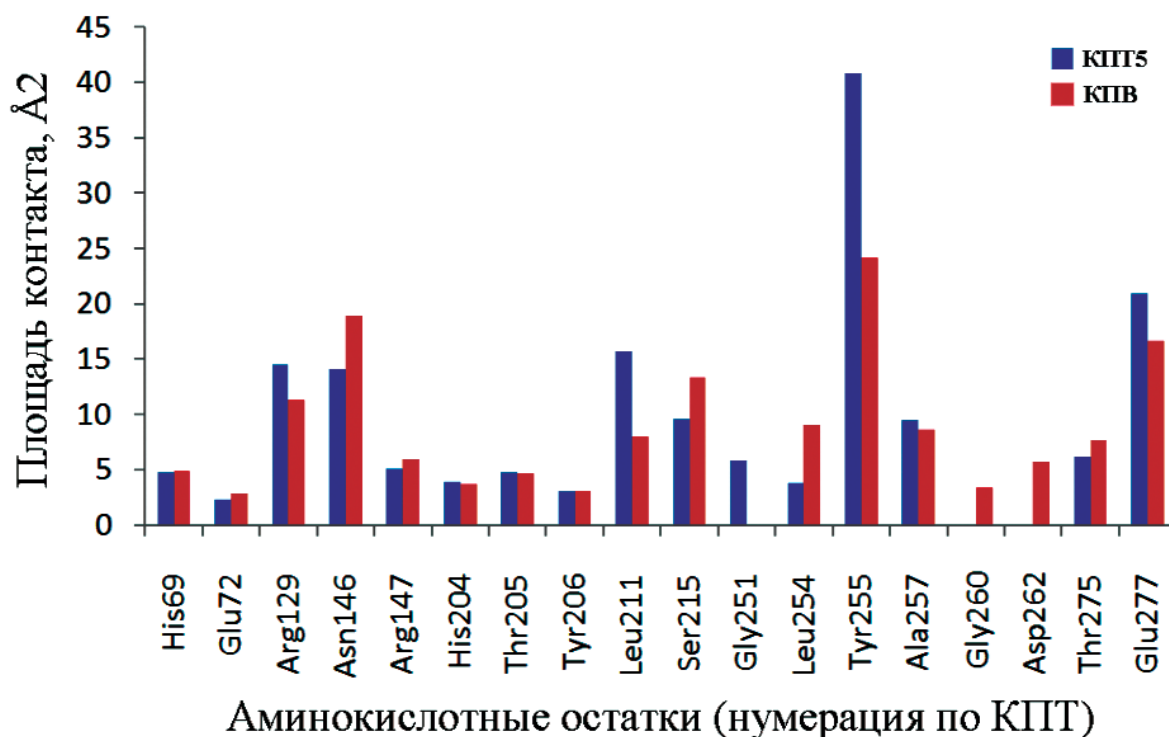


Рис. 5. Площади контактов остатков активных центров КПТ5 и КПВ с N-сульфамойл-L-фенилаланином (SPhe). Нумерация приведена по КПТ

С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

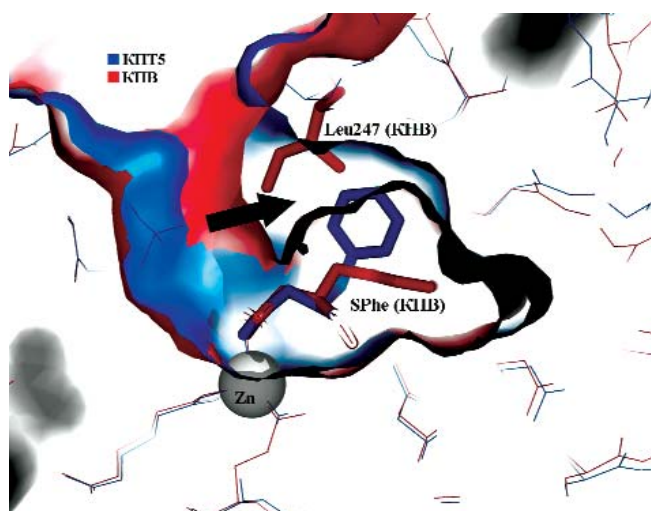


Рис. 6. Расположение молекулы N-сульфамойл-L-фенилаланина (SPhe) в S1'-субсайтах КПВ и КПТ. Лиганды и Leu247 (КПВ) изображены стержнями, остальные а.о. — линиями. Ион цинка показан сферой. В S1'-субсайте КПТ имеется показанный стрелкой свободный объем, который в КПВ занимает боковая цепь Leu247. С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

женное с Thr252, если он полярен, так и гидрофобный участок, если субстрат гидрофобен, что является структурной основой широкой субстратной специфичности КПТ. «Нижнее» положение Leu254 в КПТ зависит от природы субстрата, что является примером влияния индуцированного соответствия на селективность ферментов.

Различное положение остатка 254 в КПТ5 и КПВ (247 в КПВ) связано с различной структурой подвижной петли, на которой они расположены. Эта петля представляет собой α -спираль у КПВ и спираль 3_{10} у КПТ5 благодаря делеции в 253-м положении (246-м по КПА). Других препятствий для того, чтобы лиганд в КПВ занял то же выгодное положение, что и в КПТ5, при сравнении структуры комплексов не наблюдается. Отметим, что в карбоксипептидазе D, обладающей субстратной специфичностью, аналогичной КПВ, подвижная петля также представляет собой спираль 3_{10} , и положение субстрата «под петлей» является для этой карбоксипептидазы основным (PDB ID : 1H8L) [39], а положение, аналогичное таковому в КПВ, не реализуется

ввиду иного расположения отрицательного заряда и других групп активного центра.

Таким образом, определение структуры комплекса мутанта КПТ с заменами G215S, A251G, T257A, D260G и T262D с аналогом переходного состояния SPhe с высоким разрешением и ее сравнение со структурой аналогичного комплекса, образованного КПВ, позволило выявить ранее недооцененную структурную детерминанту субстратной специфичности металлокарбоксипептидаз. Сравнительное исследование структур показало, что при мутации пяти а.о. в кармане первичной специфичности КПТ удается добиться практически полного структурного соответствия аналогичному карману в КПВ, однако это не приводит к принципиальному изменению субстратной специфичности мутанта из-за различий в строении подвижных петель, расположенных у входа в активные центры КПВ и КПТwt и контролирующую индуцируемую субстратом конформационную перестройку этих центров.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 17-14-01256) в части выделения, очистки, поиска условий кристаллизации белка, решения, уточнения и анализа структур, Федеральной космической программы 2016-2025 (ОКР «МКС (Наука)») в части выращивания кристаллов в условиях невесомости, а также Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части получения рентгеноструктурных наборов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Perez-Silva, J.G., Espanol, Y., Velasco, G., and Quesada, V. (2016) The degradome database: expanding roles of mammalian proteases in life and disease, *Nucleic Acids Res.*, **44**, D351–D355.
- Turk, B., Turk, D., and Turk, V. (2012) Protease signalling: the cutting edge, *EMBO J.*, **31**, 1630–1643.
- Turk, B. (2006) Targeting proteases: successes, failures and future prospects, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 785–799.
- Tanco, S., Tort, O., Demol, H., Aviles, F.X., Gevaert, K., Van Damme, P., and Lorenzo, J. (2015) C-terminomics screen for natural substrates of cytosolic carboxypeptidase 1

- reveals processing of acidic protein C termini, *Mol. Cell. Proteomics.*, **14**, 177–190.
5. Sapio, M.R., and Fricker, L.D. (2014) Carboxypeptidases in disease: insights from peptidomic studies, *Proteomics Clin. Appl.*, **8**, 327–337.
 6. Остерман, А.Л., Степанов, В.М., Руденская, Г.Н., Ходова, О.М., Цаплина, И.А. (1984) Карбоксипептидаза Т – внеклеточная карбоксипептидаза термоактиномицетов – отдаленный аналог животных карбоксипептидаз, *Биохимия*, **49**, 292–301.
 7. Terpyakov, A., Polyakov, K., Obmolova, G., Strokopytov, B., Kuranova, I., Osterman, A.L., Grishin, N., Smulevitch, S., Zagnitko, O., and Galperina, O. (1992) Crystal structure of carboxypeptidase T from *Thermoactinomyces vulgaris*, *Eur. J. Biochem.*, **208**, 281–288.
 8. Schechter, I., and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 157–162.
 9. Auld, D.S., Galdes, A., Geoghegan, K.F., Holmquist, B., Martinelli, R., and Vallee, B.L. (1984) Cryospectrokinetic characterization of intermediates in biochemical reactions: carboxypeptidase A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5041–5045.
 10. Reeke, G.N., Hartsuck, J.A., Ludwig, M.L., Quioco, F.A., Steitz, T.A., and Lipscomb, W.N. (1967) The structure of carboxypeptidase a, vi. Some results at 2.0- \AA resolution, and the complex with glycyl-tyrosine at 2.8- \AA resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 2220–2226.
 11. Gardell, S.J., Craik, C.S., Clauser, E., Goldsmith, E. J., Stewart, C.B., Graf, M., and Rutter, W.J. (1988) A novel rat carboxypeptidase, CPA2: characterization, molecular cloning, and evolutionary implications on substrate specificity in the carboxypeptidase gene family, *J. Biol. Chem.*, **263**, 17828–17836.
 12. Stepanov, V.M. (1995) Carboxypeptidase T, *Methods Enzymol.*, **248**, 675–683.
 13. Osterman, A.L., Grishin, N.V., Smulevitch, S.V., Matz, M.V., Zagnitko, O.P., Revina, L.P., and Stepanov, V.M. (1992) Primary structure of carboxypeptidase T: delineation of functionally relevant features in Zn-carboxypeptidase family, *J. Protein. Chem.*, **11**, 561–570.
 14. Reeck, G.R., Walsh, K.A., Hermodson, M.A., and Neurath, H. (1971) New forms of bovine carboxypeptidase B and their homologous relationships to carboxypeptidase A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1226–1230.
 15. Bunnage, M.E., Blagg, J., Steele, J., Owen, D.R., Allerton, C., McElroy, A.B., Miller, D., Ringer, T., Butcher, K., Beaumont, K., Evans, K., Gray, A.J., Holland, S.J., and Feeder, N., (2007) Discovery of potent & selective inhibitors of activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor for the treatment of thrombosis, *J. Med. Chem.*, **50**, 6095–6103.
 16. Bown, D.P., and Gatehouse, J.A. (2004) Characterization of a digestive carboxypeptidase from the insect pest corn earworm (*Helicoverpa armigera*) with novel specificity towards C-terminal glutamate residues, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 2000–2011.
 17. Edge, M., Forder, C., Hennam, J., Lee, I., Tonge, D., Hardern, I., Fitton, J., Eckersley, K., East, S., Shufflebottom, A., Blakey, D., and Slater, A. (1998) Engineered human carboxypeptidase B enzymes that hydrolyse hippuryl-L-glutamic acid: reversed-polarity mutants, *Protein Eng.*, **11**, 1229–1234.
 18. Grishin, A.M., Akparov V.Kh., and Chestukhina, G.G. (2008) Leu254 residue and calcium ions as new structural determinants of carboxypeptidase T substrate specificity, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1140–1145.
 19. Akparov, V.Kh., Grishin, A.M., Yusupova, M.P., Ivanova, N.M., and Chestukhina, G.G. (2007) Structural principles of the wide substrate specificity of *Thermoactinomyces vulgaris* carboxypeptidase T. reconstruction of the carboxypeptidase B primary specificity pocket, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 416–423.
 20. Акпаров В.Х., Белянова Л.П., Баратова Л.А., Степанов В.М. (1979) Субтилизин 72 – сериновая протеаза из *B. subtilis* штамма 72 – фермент, близкий субтилизину Карлсберг, *Биохимия*, **44**, 886–891.
 21. Люблинская Л.А., Якушева Л.Д., Степанов В.М. (1977) Синтез пептидных субстратов субтилизина и их аналогов, *Биоорганическая химия*, **3**, 273–279.
 22. Cueni, L.B., Bazzone, T.J., Riordan, J.F., and Vallee, B.L. (1980) Affinity chromatographic sorting of carboxypeptidase A and its chemically modified derivatives, *Anal. Biochem.*, **107**, 341–349.
 23. Novagen pET System Manual TB055 (1997) 7th Edn, Novagen Madison WI.
 24. Trachuk, L., Letarov, A., Kudelina, I.A., Yusupova, M.P., and Chestukhina, G.G. (2005) *In vitro* refolding of carboxypeptidase T precursor from *Thermoactinomyces vulgaris* obtained in *Escherichia coli* as cytoplasmic inclusion bodies, *Protein. Expr. Purif.*, **40**, 51–59.
 25. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
 26. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680–685.
 27. Cornish-Bowden, A. (2013) Fundamentals of enzyme kinetics, 4th Edn., Wiley-VCH, Weinheim.
 28. Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state, *J. Mol. Biol.*, **372**, 774–797.
 29. Takahashi, S., Tsurumura, T., Aritake, K., Furubayashi, N., Sato, M., Yamanaka, M., Hirota, E., Sano, S., Kobayashi, T., Tanaka, T., Inaka, K., Tanaka, H., and Urade, Y. (2010) High-quality crystals of human haematopoietic prostaglandin D synthase with novel inhibitors, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **66**, 846–850.
 30. Куранова И.П., Смирнова Е.А., Абрамчик Ю.А., Чупова Л.А., Есипов Р.С., Акпаров В.Х., Тимофеев В.И., Ковальчук М.В. (2011) Выращивание кристаллов фосфоантетеин аденилилтрансферазы, карбоксипептидазы Т и тимидинфосфориллазы на международной космической станции методом встречной диффузии в капилляре, *Кристаллография*, **56**, 944–951.
 31. McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007) Phaser crystallographic software, *J. Appl. Crystallogr.*, **40**, 658–674.
 32. Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **53**, 240–255.
 33. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **60**, 2126–2132.
 34. Park, J.D., Kim, D.H., Kim, S.J., Woo, J.R., and Ryu, S.E. (2002) Sulfamide-based inhibitors for carboxypeptidase A. Novel type transition state analogue inhibitors for zinc proteases, *J. Med. Chem.*, **45**, 5295–5302.
 35. Akparov, V.Kh., Sokolenko, N., Timofeev, V., and Kuranova, I. (2015) Structure of the complex of carboxypeptidase B and N-sulfamoyl-L-arginine, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **71**, 1335–1340.
 36. Акпаров В.Х., Тимофеев В.И., Махсуди Н.Н., Куранова И.П. (2017) Пространственная структура свиной панкреатической карбоксипептидазы В с ацетат-ио-

- ном и двумя атомами цинка в активном центре, *Кристаллография*, **62**, 224–228.
37. Akparov, V., Timofeev, V., Khaliullin, I., Svedas, V., and Kuranova, I. (2018) Structure of the carboxypeptidase B complex with N-sulfamoyl-L-phenylalanine – a transition state analog of non-specific substrate, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **36**, 956–965.
38. Akparov, V., Timofeev, V., Khaliullin, I., Svedas, V., Kuranova, I., and Rakitina, T. (2017) Crystal structures of carboxypeptidase T complexes with transition-state analogs, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1–9.
39. Aloy, P., Companys, V., Vendrell, J., Aviles, F.X., Fricker, L.D., Coll, M., and Gomis-Ruth, F.X. (2001) The crystal structure of the inhibitor-complexed carboxypeptidase D domain II and the modeling of regulatory carboxypeptidases, *J. Biol. Chem.*, **276**, 16177–16184.

MOBILE LOOP IN THE ACTIVE SITE OF METALLOCARBOXYPEPTIDASES AS AN UNDERESTIMATED DETERMINANT OF SUBSTRATE SPECIFICITY

V. Kh. Akparov^{1*}, V. I. Timofeev^{2,3}, I. G. Khaliullin⁴,
G. E. Konstantinova¹, I. P. Kuranova^{2,3}, T. V. Rakitina^{3,5},
and V. K. Svedas⁶

¹ State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 117545 Moscow, Russia; E-mail: valery.akparov@yandex.ru

² Shubnikov Institute of Crystallography of Federal Scientific Research Centre «Crystallography and Photonics», Russian Academy of Sciences, 119333 Moscow, Russia; E-mail: tostars@mail.ru

³ National Research Centre «Kurchatov Institute», 123098 Moscow, Russia; E-mail: taniarakitina@yahoo.com

⁴ Moscow Institute of Physics and Technology (State University), 141700 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia; E-mail: khig@mail.ru

⁵ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia; E-mail: aniarakitina@yahoo.com

⁶ Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: vyta@belozersky.msu.ru

Received June 5, 2018

Revision received September 19, 2018

Accepted September 19, 2018

It is generally accepted that the primary specificity of metallo-carboxypeptidases is mainly determined by the structure of the so-called primary specificity pocket. However, the G215S/A251G/T257A/D260G/T262D mutant of carboxypeptidase T from *Thermoactinomyces vulgaris* (CPT) with the primary specificity pocket fully reproducing the one in pancreatic carboxypeptidase B (CPB) retained the broad, mainly hydrophobic substrate specificity of the wild-type enzyme. In order to elucidate factors affecting substrate specificity of metallo-carboxypeptidases and the reasons for the discrepancy with the established views, we have solved the structure of the complex of the CPT G215S/A251G/T257A/D260G/T262D mutant with the transition state analogue *N*-sulfamoyl-L-phenylalanine at a resolution of 1.35 Å and compared it with the structure of similar complex formed by CPB. The comparative study revealed a previously underestimated structural determinant of the substrate specificity of metallo-carboxypeptidases and showed that even if substitution of five amino acid residues in the primary specificity pocket results in its almost complete structural correspondence to the analogous pocket in CPB, this does not lead to fundamental changes in the substrate specificity of the mutant enzyme due to the differences in the structure of the mobile loop located at the active site entrance that affects the substrate-induced conformational rearrangements of the active site.

Keywords: metallo-carboxypeptidase T from *Thermoactinomyces vulgaris*, metallo-carboxypeptidase B, S1'-subsite, substrate specificity, *N*-sulfamoyl-L-phenylalanine, X-ray analysis