

O-АЦЕТИЛГОМОСЕРИНСУЛЬФИДРИЛАЗА ИЗ *Clostridioides difficile*: РОЛЬ ОСТАТКОВ ТИРОЗИНА АКТИВНОГО ЦЕНТРА

© 2023 В.В. Куликова*, С.В. Ревтович, А.Д. Лыфенко,
Е.А. Морозова, В.С. Коваль, Н.П. Бажулина, Т.В. Демидкина

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: vitviku@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.11.2022

После доработки 10.02.2023

Принята к публикации 10.02.2023

O-ацетилгомосеринсульфидрилаза является одним из ключевых ферментов в биосинтезе метионина в *Clostridioides difficile*. Механизм реакции γ -замещения *O*-ацетил-L-гомосерина, катализируемой этим ферментом, наименее изучен среди пиридоксаль-5'-фосфат-зависимых ферментов, участвующих в метаболизме цистеина и метионина. Для выяснения роли остатков активного центра Tyr52 и Tyr107 получены четыре мутантные формы фермента с заменами на фенилаланин и аланин. Исследованы каталитические и спектральные свойства мутантных форм. Скорость реакции γ -замещения, катализируемой мутантными формами с заменой остатка Tyr52, уменьшилась более чем на три порядка по сравнению с ферментом дикого типа. Мутантные формы Tyr107Phe и Tyr107Ala практически не катализировали данную реакцию. Замены остатков Tyr52 и Tyr107 привели к уменьшению сродства апофермента к кофактору на три порядка и изменениям ионного состояния внутреннего альдимида фермента. Полученные результаты позволили сделать предположение, что остаток Tyr52 участвует в обеспечении оптимального положения каталитического кофактор-связывающего остатка лизина на стадиях отрыва C- α -протона и элиминирования боковой группы субстрата. Остаток Tyr107 может выполнять роль общего кислотного катализатора на стадии элиминирования ацетата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *O*-ацетилгомосеринсульфидрилаза, пиридоксаль-5'-фосфат, реакция γ -замещения, сайт-направленный мутагенез.

DOI: 10.31857/S0320972523050032, EDN: AXKFQQ

ВВЕДЕНИЕ

Пиридоксаль-5'-фосфат (ПДФ)-зависимая *O*-ацетилгомосеринсульфидрилаза (OASH, КФ 2.5.1.49) участвует в биосинтезе метионина, катализируя реакцию γ -замещения *O*-ацетил-L-гомосерина (OAH), приводящую к образованию предшественника метионина – L-гомоцистеина (рис. 1). Фермент обнаружен в некоторых микроорганизмах, включая патогенные бактерии класса Clostridia [1, 2]. Одними из самых распространенных и агрессивных возбудителей внутрибольничных инфекций в последние годы стали антибиотикорезистентные штаммы *Clostridioides difficile*. Ранее нами был клонирован и экспрессирован в клетках *Escherichia coli* ген OASH из *C. difficile*, получены гомогенные препараты фермента и ис-

следованы его биохимические свойства [2]. Данные о характеристиках ПДФ-зависимых ферментов из патогенных микроорганизмов становятся все более актуальными, поскольку некоторые из них не присутствуют в клетках млекопитающих и поэтому являются перспективными мишенями для создания новых антибиотиков.

Механизм многостадийной реакции γ -замещения, катализируемой OASH, является одним из самых сложных и неисследованных в ПДФ-зависимом катализе превращений аминокислот. Первые очень ограниченные биохимические характеристики OASH были получены для ферментов, выделенных из *Neurospora* [3], *Saccharomyces cerevisiae* [4] и *Corynebacterium ethanolaminophilum* [5]. Большинство публикаций, в которых упомина-

Принятые сокращения: ПДФ – пиридоксаль-5'-фосфат; OAH – *O*-ацетил-L-гомосерин; OASH – *O*-ацетилгомосеринсульфидрилаза.

* Адресат для корреспонденции.

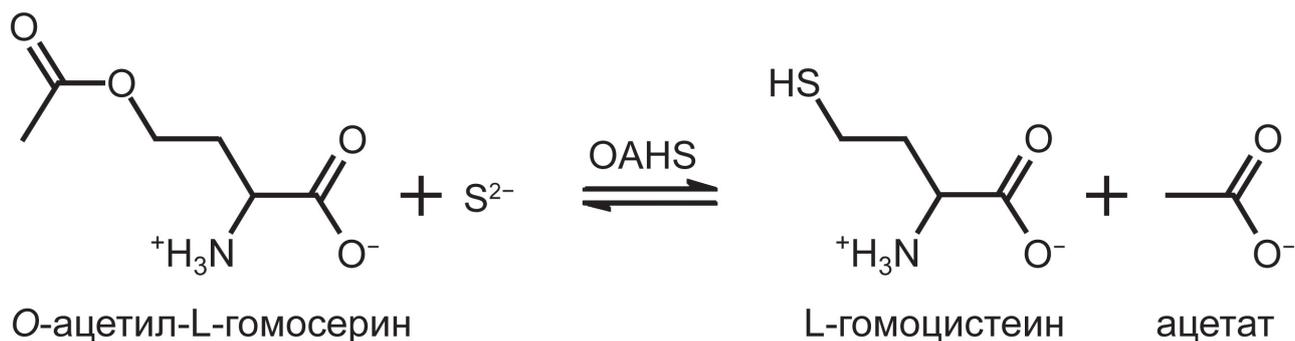


Рис. 1. Схема реакции γ -замещения, катализируемой *O*-ацетилгомосеринсульфгидрилазой

ются ОАHS, относится к исследованиям путей синтеза метионина в бактериях, грибах и дрожжах. Этот вопрос наиболее изучен для рода *Corynebacterium*, для некоторых бактерий которого были показаны два пути синтеза метионина [6]. Единственный путь прямого сульфидрирования, обуславливающий важность ОАHS для микроорганизма, был установлен для *Pseudomonas aeruginosa* [7] и *Leptospira meyeri* [8]. В наших предыдущих работах мы также предположили, что в *C. difficile* и *Clostridium novyi* используется один путь биосинтеза метионина – путь прямого сульфидрирования, в котором ОАHS играет ключевую роль [1, 2].

В настоящее время определены пространственные структуры ОАHS с доказанной субстратной специфичностью из *Thermus thermophilus* (PDB 1ULQ, 2CTZ) [9], *Wolinella succinogenes* (PDB 3RI6) [10, 11] и *Thermotoga maritima* (PDB 7KB0, 7KB1) [12]. Сравнение этих структур со структурами ПЛФ-зависимых ферментов, катализирующих реакции превращений серосодержащих аминокислот, показало, что ОАHS принадлежит к структурному классу I, подклассу цистатионин- β -лиазы [13]. Выравнивание аминокислотных последовательностей ОАHS и ферментов подкласса цистатионин- β -лиазы и анализ имеющихся пространственных структур выявили консервативность двух остатков тирозина их активных центров [1]. В структуре ОАHS из *T. maritima* остаток Tyr58, соответствующий остатку Tyr52 ОАHS из *C. difficile*, образует водородную связь с фосфатной группой ПЛФ, остаток Tyr107 находится в π -стекинге с пиридиновым кольцом ПЛФ, обеспечивая электроноакцепторные свойства кофактора. Остатки Tyr114 и Tyr113 метионин- γ -лиазы из *Pseudomonas putida* и *Citrobacter freundii*, гомологичные остатку Tyr107, предположительно, выполняют роль общего кислотного катализатора на стадии элиминирования γ -заместителя [14, 15].

Для остатка Tyr58 метионин- γ -лиазы из *C. freundii*, гомологичного остатку Tyr52 ОАHS, было сделано предположение, что он необходим для оптимального положения боковой аминогруппы каталитического ПЛФ-связывающего остатка Lys210 метионин- γ -лиазы на стадиях отрыва C- α - и C- β -протонов [16].

Целью настоящей работы было выяснение роли остатков Tyr52 и Tyr107 ОАHS из *C. difficile*. Для этого были сконструированы четыре плазмиды с геном ОАHS из *C. difficile*, содержащие единичные замены консервативных остатков тирозина активного центра на фенилаланин и аланин. Мутантные формы фермента были экспрессированы в клетках *E. coli*, получены очищенные препараты, проанализировано влияние замен на каталитические и спектральные свойства фермента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сайт-направленный мутагенез. Сайт-направленный мутагенез проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве матрицы использовали плазмиду, полученную клонированием гена ОАHS в вектор Bluescript II SK^(+/-) («Agilent», США). Последовательности праймеров, использованных для замены Tyr52Phe, Tyr52Ala, Tyr107Phe и Tyr107Ala («Синтол», Россия), представлены в табл. 1.

После проведения ПЦР из реакционных смесей выделяли ампликоны с использованием набора для выделения ДНК («Fermentas», Латвия). Очищенные препараты ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NcoI и XhoI и лигировали с плазмидой pET28a («Novagen», Германия), обработанным этими же ферментами. Полученные смеси трансформировали электропорацией в клетки *E. coli* DH10B и выращивали на твердой среде (1,8% (w/v) агар на среде Лурия–Бертани (LB)) с 50 мкг/мл канамицина. Выращенные колонии переносили

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных для сайт-направленного мутагенеза

Вариант замены	Последовательность праймеров 5'→3'
Tyr52Phe	GGATTGCTTATTCTTGA <u>AA</u> ATATATGTCCATCAACTT
Tyr52Ala	GGATTGCTTATTCTTGA <u>TG</u> CTATATGTCCATCAACTT
Tyr107Phe	GTA <u>AA</u> TGAATGTTCC <u>AA</u> TA <u>CT</u> TTTTGAAGAACAAGT
Tyr107Ala	GTA <u>AA</u> TGAATGTTCC <u>TG</u> CTACTTTTTGAAGAACAAGT

Примечание. Кодоны, в которые были внесены замены, подчеркнуты.

в жидкую среду LB с добавлением канамицина и растили в течение 16–18 ч. Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора для выделения плазмид («Thermo Scientific», США) и идентифицировали путем аналитической рестрикции. Фрагменты, содержащие замены, были переклонированы в плазмиду pET28a. Точность клонирования контролировали путем секвенирования вставок ДНК («Геном», Москва). Клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали плазмидами, содержащими вставки.

Выращивание бактериальной массы и очистка ферментов. Выращивание клеток *E. coli* BL21(DE3), содержащих плазмиды с генами мутантных форм, и очистку ферментов проводили, как описано ранее для фермента дикого типа [2]. Концентрацию очищенных препаратов фермента определяли по методу Бредфорда [17]. Гомогенность препаратов проверяли при помощи ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях [18].

Кинетические исследования. Реакцию γ -замещения, катализируемую ОАHS, проводили при 25 °С, как описано ранее [2]. Реакционная смесь (200 мкл) содержала 0,05 М K_2HPO_4 /0,05 М K_2HPO_4 (pH 7,5); 0,1 мМ ПЛФ; 10 мМ ОАН и 5 мМ Na_2S . Реакцию инициировали добавлением 10–100 мкг белка. Количество образовавшегося гомоцистеина рассчитывали по методу Kredich и Becker [19]. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль гомоцистеина в минуту.

Изотопный обмен C- α -протона субстрата в комплексах с ферментом. Кинетику реакции обмена C- α -протона ОАН на дейтерий, катализируемой мутантными формами, регистрировали при помощи ^1H -ЯМР-спектроскопии. Изотопный обмен протонов аминокислот проводили в 0,5 мл D_2O , содержащей 0,05 М калий-фосфат (pD = 7,1); 0,1 мМ ПЛФ; 100 мМ ОАН и 5 мМ фермента. Через 24 ч после инкубации при 25 °С фермент инактивировали нагреванием (90 °С, 5 мин) и отделяли центрифугированием при 9660 g (r_{cp} = 6 см) в течение

5 мин. Спектры ^1H -ЯМР записывали с использованием спектрометра Bruker AMXIII-400 («Bruker», США) с рабочей частотой 400 МГц. Сигналы C- α -протона аминокислоты интегрировали с помощью модифицированной программы автоматизации enzkIn, входящей в состав программ XWIN_NMR.

Получение холоферментов и апоферментов. Для получения холофермента к раствору белка (10–20 мг/мл) в 0,05 М калий-фосфатном буфере (pH 7,5) добавляли 50-кратный молярный избыток ПЛФ и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Избыток ПЛФ удаляли диализом против буфера того же состава при +4 °С. Для получения апофермента к 0,2 мМ раствору белка в 0,05 М калий-фосфатном буфере (pH 7,5) добавляли 20 мМ раствор D, L-пеницилламина. Раствор инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем избыток D, L-пеницилламина удаляли диализом при +4 °С против буфера того же состава.

Спектральные исследования. Для получения спектров поглощения мутантных форм холоферментов и их комплексов с ингибиторами использовали спектрофотометр Cary-50 («Varian», США). Спектры регистрировали в 0,1 М калий-фосфатном буфере (pH 7,5) при концентрации фермента 0,5–2 мг/мл и 100 мМ L-метионина или D, L-пропаргилглицина. Содержание ПЛФ в холоферментах определяли, используя коэффициент поглощения ПЛФ $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ в 0,1 М NaOH при 390 нм [20]. Для определения ионного состояния внутренних альдиминов мутантных форм спектры поглощения были разложены методом логнормального разложения на полосы отдельных электронных переходов их таутомеров и конформеров [21].

Определение константы диссоциации (K_d) комплекса фермента с ПЛФ. К растворам апофермента (0,02 мМ) в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,5), содержащем 1 мМ ДТТ, добавляли аликвоты раствора ПЛФ (0,2–200 мМ). После 30 мин инкубации при 30 °С

растворы помещали в центрифужный концентратор (30 000 Da, «Sartorius», Германия) и центрифугировали при 2795 g ($r_{cp} = 10$ см) в течение 5 мин для освобождения от несвязанного ПЛФ. Содержание ПЛФ в холоферментах определяли, как описано выше. Полученные данные обрабатывали в координатах Скэтчарда [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Кинетические исследования. Замена остатков тирозина активного центра ОАНС привела к значительным изменениям каталитических параметров фермента. Мутантные формы с заменой Tyr52 катализировали реакцию γ -замещения ОАН со скоростями, более чем на три порядка меньшими, чем фермент дикого типа, значения K_m ОАН увеличились в несколько раз (табл. 2). Для мутантных форм Tyr107Phe и Tyr107Ala не удалось обнаружить образование L-гомоцистеина, продукта реакции γ -замещения. При инкубации мутантных форм с ОАН в D₂O в спектрах ¹H-ЯМР наблюдалось уменьшение интенсивности сигнала C- α -протона субстрата (табл. 2), что свидетельствовало о том, что мутантные формы связывали субстрат и катализировали отрыв C- α -протона из внешнего альдимида.

Сродство к кофактору. Ухудшение сродства к кофактору наблюдалось во всех мутантных формах: величина константы диссоциации комплекса фермента с ПЛФ (K_d) увеличилась на три порядка по сравнению с величиной, полученной для фермента дикого типа (табл. 3).

Спектральные исследования. В спектрах поглощения холоферментов Tyr107Phe, Tyr107Ala, Tyr52Phe и Tyr52Ala имеются полосы поглощения с максимумами в области 325–340 нм и 410–416 нм, которые при данных условиях эксперимента (рН 7,5) могут соответствовать одному из ионных состояний внутреннего альдимида – катионному или нейтральному (рис. 2). Для определения ионного состояния внутреннего альдимида мутантных форм было применено логнормальное разложение спектров поглощения на полосы, соответствующие отдельным электронным переходам альдиминов ПЛФ с аминокислотами, используя две модели: катионную и нейтральную (рис. 2). Основным критерием корректности использованных моделей для описания спектров было соответствие количества таутомеров и конформеров количеству связанного ПЛФ. Анализ данных разложения спектров поглощения всех четырех мутантных форм показал, что при использовании нейтральной модели количество ПЛФ, связанного с ферментом, соответствует суммарному количеству найденных таутомеров и конформеров. Поэтому для разложения спектров поглощения холоферментов всех четырех мутантных форм нейтральная модель является наиболее адекватной, и, следовательно, внутренний альдимин в активных центрах мутантных ферментов находится в нейтральной форме, содержащей таутомеры III, IV, V, и конформеры форм III и V. На рис. 3 представлено разложение спектров поглощения мутантных форм холофермента при рН 7,5 в соответствии с нейтральной моделью.

Таблица 2. Кинетические параметры реакции γ -замещения ОАН

Фермент	K_m , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_m , М ⁻¹ ·с ⁻¹	Степень обмена C- α -протона ОАН в D ₂ O за 24 ч
Tyr52Phe	4,4 ± 0,3	0,05 ± 0,003	11	40%
Tyr52Ala	3,2 ± 0,2	0,06 ± 0,003	19	50%
Tyr107Phe	н/о	н/о	н/о	35%
Tyr107Ala	н/о	н/о	н/о	20%
Дикий тип*	0,60 ± 0,05	94,12 ± 1,88	1,6 × 10 ⁵	90%

Примечание. * Литературные данные [2]. н/о – не определено.

Таблица 3. Сродство фермента к ПЛФ

Параметры	ОАНС дикого типа*	Tyr52Phe	Tyr52Ala	Tyr107Phe	Tyr107Ala
K_d , М	(1,3 ± 0,1) × 10 ⁻⁵	(2,7 ± 0,2) × 10 ⁻²	(2,9 ± 0,2) × 10 ⁻²	(1,6 ± 0,1) × 10 ⁻²	(1,4 ± 0,1) × 10 ⁻²
ΔG , ккал/моль	-6,64	-2,13	-2,06	-2,44	-2,51

Примечание. * Литературные данные [2].

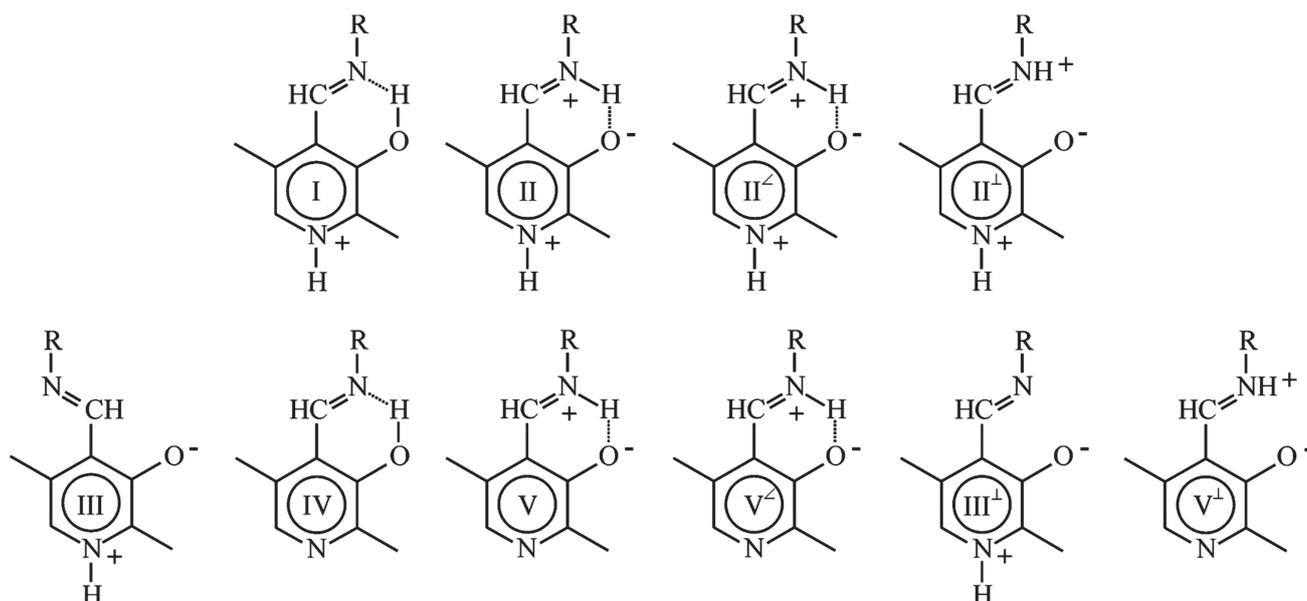


Рис. 2. Ионные формы внутреннего альдимины. I–II – структуры, относящиеся к катионной форме кофактора, III–V – структуры, относящиеся к нейтральной форме кофактора. Обозначение структур II^z и V^z относится к конформерам соответствующих ионных форм, у которых альдиминная группа частично выведена из плоскости пиридинового цикла, но при этом сохраняется водородная связь с атомом кислорода пиридинового кольца. Структуры II⁺, III⁺ и V⁺ обозначают конформеры с альдиминной группой, полностью выведенной из сопряжения с пиридиновым циклом

Экспериментальные параметры полос поглощения таутомерных и конформерных структур представлены в табл. 4.

Для четырех мутантных форм сняты спектры поглощения комплексов с ингибиторами фермента дикого типа L-метионином и D, L-пропаргилглицином. На рис. 4 приведены спектры для Tyr52Ala мутантной формы фермента в сравнении со спектрами фермента дикого типа. Спектры поглощения для остальных мутантных форм имели аналогичный вид.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ионное состояние внутренних альдиминов в мутантных формах. В спектрах поглощения мутантных холоферментов ОАHS при pH 7,5 наблюдались полосы в областях 330 нм и 416 нм, характерные для внутренних альдиминов ПЛФ-зависимых ферментов (рис. 3). Первой стадией любой реакции, катализируемой ПЛФ-зависимыми ферментами, является образование внешнего альдимины, как результат трансальдиминирования между внутренним альдимином и аминокислотой-субстратом. Знание того, в какой ионной и таутомерной форме находится внутренний альдимин, необходимо для понимания механизма реакции. С этой целью было проведено разложение спектров поглощения на полосы, соответствующие отдельным электронным переходам альдими-

нов ПЛФ с аминокислотами. Как нами было показано ранее, внутренний альдимин ОАHS дикого типа находится в катионной форме [2], содержащей два таутомера – кетоенамин (структура II) и енолимин (структура I), а также два конформера кетоенамина (структуры II^z и II⁺) (рис. 2). Наши результаты позволяют сделать вывод, что внутренние альдимины мутантных форм ОАHS при pH 7,5 существуют в виде нейтральной формы с преобладанием кетоенамина V, у которого атом пиридинового азота депротонирован. В ферменте дикого типа активной формой является кетоенамин II с положительно заряженным атомом пиридинового азота, электроноакцепторные свойства которого облегчают нуклеофильную атаку аминокислотной группы субстрата на C4'-атом кофермента. У нейтрального кетоенамина V отсутствует положительный заряд на атоме пиридинового азота, поэтому он обладает меньшей реакционной способностью к образованию внешнего альдимины по сравнению с кетоенамином II.

Взаимодействие с ингибиторами. Для фермента дикого типа было показано ингибирование реакции конечным продуктом биосинтетического пути – L-метионином, и специфическим ингибитором ПЛФ-зависимых ферментов, участвующих в метаболизме цистеина и метионина – D, L-пропаргилглицином [2]. Значительное снижение скорости реакции, катализируемой мутантными фор-

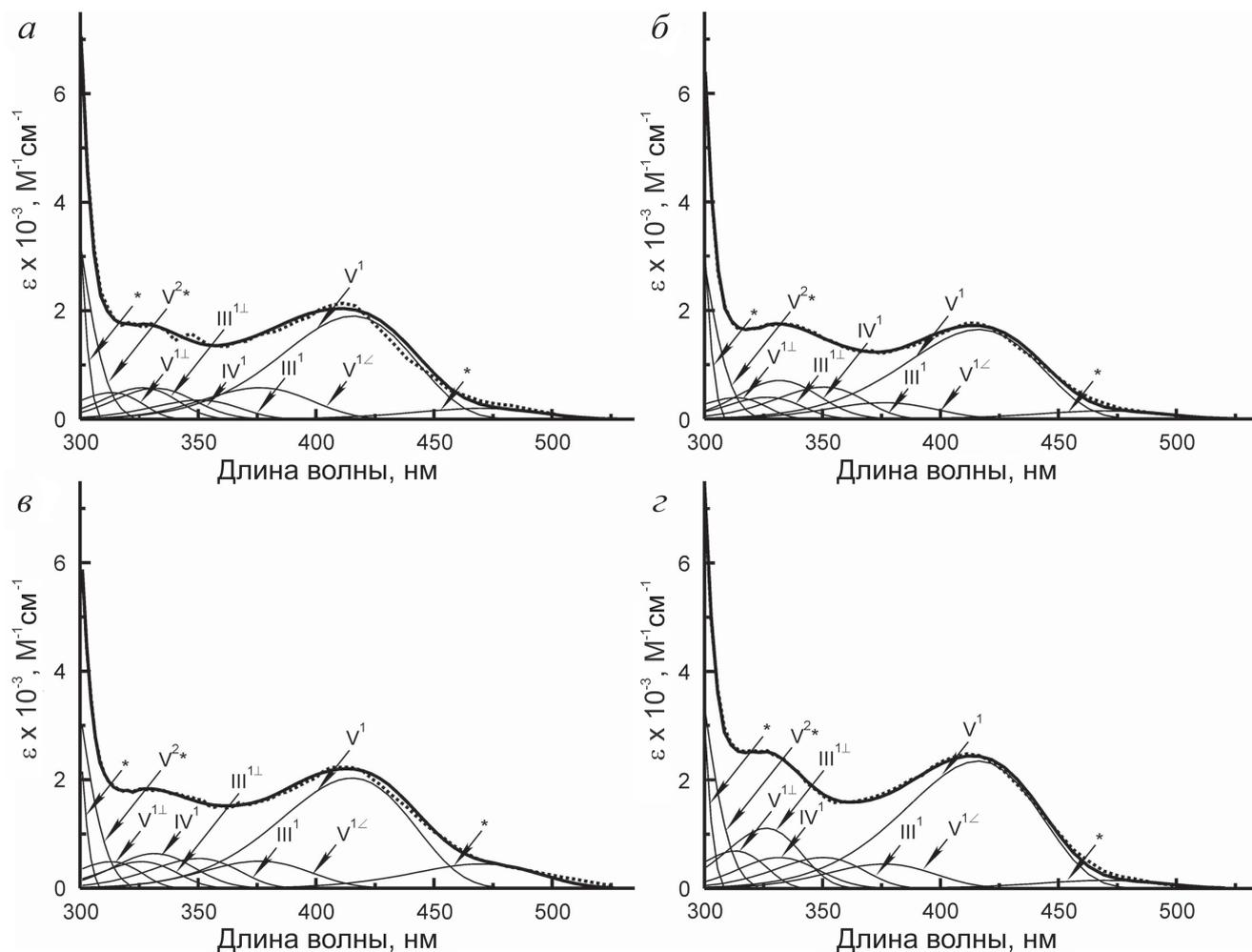


Рис. 3. Разложение спектров поглощения внутренних альдимinov мутантных форм OANS (*a* – Tyr107Phe; *б* – Tyr107Ala; *в* – Tyr52Phe; *г* – Tyr52Ala) при pH 7,5 на полосы отдельных электронных переходов их таутомеров и конформеров: точки – экспериментальные данные, жирные линии – расчетные данные, тонкие линии – полосы, соответствующие отдельным электронным переходам. Обозначение структур соответствует данным рис. 2 и табл. 4. Надстрочные индексы (1, 2) относятся к первому и второму электронным переходам соответствующих структур. Надстрочный индекс (\perp) относится к конформеру структуры V, у которого альдиминная группа частично выведена из сопряжения с пиридиновым циклом, но сохраняется водородная связь между альдиминным атомом азота и оксигруппой кофактора. Надстрочный индекс (\angle) относится к конформерам структур III и V, у которых альдиминная группа полностью выведена из сопряжения с пиридиновым циклом и находится в плоскости, перпендикулярной плоскости пиридинового кольца. Полосы, о которых нет или недостаточно информации, указаны стрелками, помеченными * и V^{2*}

мами OANS, не позволило провести исследование ингибирования реакции γ -замещения этими ингибиторами. Спектральные характеристики комплексов мутантных форм с ингибиторами (рис. 4) в основном сходны с характеристиками, полученными для фермента дикого типа [2]. Уменьшение максимума поглощения в области 416 нм и увеличение поглощения в области 330 нм в комплексах мутантных форм с L-метионином и D, L-пропаргилглицином, скорее всего, свидетельствует об изменении равновесия между таутомерными формами внешнего альдимина (рис. 5). Кроме того, в этой области могут поглощать промежуточные продукты реакции с тетраэдрическим C4'-атомом углерода (рис. 6, интермедиаты 4 и 5).

Каталитические свойства мутантных ферментов. ПЛФ-зависимые ферменты, участвующие в биосинтезе метионина в бактериях, образуют эволюционно родственное семейство [23] и имеют много общего в строении активных центров и механизмах катализируемых реакций [13, 24]. На рис. 6 представлен предполагаемый механизм реакции γ -замещения, катализируемой OANS. После образования внешнего альдимина между коферментом и субстратом происходит отрыв C- α -протона с образованием хиноидного интермедиата, затем – протонирование C4'-атома кофактора с образованием кетимина. Дальнейший отрыв C- β -протона приводит к отщеплению ацетильной группы субстрата. Присоединение сульфид-

Таблица 4. Параметры, полученные при разложении спектров поглощения мутантных форм ОАHS на полосы отдельных переходов

Мутантная форма ОАHS	Структуры	E (эВ)	$\nu \times 10^{-3}$ (см $^{-1}$)	λ (нм)	$\epsilon \times 10^{-3}$ (М $^{-1}$ ·см $^{-1}$)	$W \times 10^{-3}$ (см $^{-1}$)	ρ	f	n (%)
Tyr107Phe	V ¹ (кетонамин)	2,98	24,06	415,5	1,90	3,95	1,50	0,07	24
	V ^{1z} (кетонамин)	3,30	26,58	376,2	0,65	3,87	1,37	0,02	8
	III ¹ (енолимин)	3,54	28,53	350,5	0,35	3,65	1,45	0,01	3
	IV ¹ (кетонамин)	3,74	30,14	331,8	0,57	3,68	1,22	0,02	10
	III ^{1⊥} (енолимин)	3,80	30,64	326,4	0,58	3,53	1,36	0,02	7
	V ^{1⊥}	3,96	31,92	313,3	0,49	3,47	1,47	0,02	8
	V ^{2*}	4,40	35,49	281,8	7,00	4,78	1,32	0,30	
	*	4,44	35,81	279,3	25,20	4,30	1,56	0,98	
Tyr107Ala	V ¹ (кетонамин)	2,98	24,02	416,3	1,65	4,00	1,53	0,06	21
	V ^{1z} (кетонамин)	3,30	26,58	376,2	0,30	3,87	1,37	0,01	4
	III ¹ (енолимин)	3,54	28,53	350,5	0,59	3,65	1,45	0,02	6
	IV ¹ (кетонамин)	3,74	30,14	331,8	0,71	3,68	1,22	0,02	10
	III ^{1⊥} (енолимин)	3,80	30,64	326,4	0,40	3,53	1,36	0,01	3
	V ^{1⊥}	3,96	31,92	313,3	0,39	3,47	1,47	0,01	4
	V ^{2*}	4,40	35,49	281,8	6,20	4,78	1,32	0,26	
	*	4,44	35,81	279,3	23,50	4,30	1,56	0,91	
Tyr52Phe	V ¹ (кетонамин)	2,98	24,06	415,5	2,03	3,95	1,50	0,07	24
	V ^{1z} (кетонамин)	3,30	26,58	376,2	0,50	3,87	1,37	0,02	8
	III ¹ (енолимин)	3,54	28,53	350,5	0,55	3,65	1,45	0,02	6
	IV ¹ (кетонамин)	3,74	30,14	331,8	0,64	3,68	1,22	0,02	10
	III ^{1⊥} (енолимин)	3,80	30,64	326,4	0,49	3,53	1,36	0,02	7
	V ^{1⊥}	3,96	31,92	313,3	0,49	3,47	1,47	0,02	8
	V ^{2*}	4,40	35,49	281,8	7,20	4,78	1,32	0,31	
	*	4,44	35,81	279,3	22,20	4,30	1,56	0,87	
Tyr52Ala	V ¹ (кетонамин)	2,98	24,02	416,3	2,35	4,00	1,53	0,08	28
	V ^{1z} (кетонамин)	3,30	26,58	376,2	0,45	3,87	1,37	0,02	8
	III ¹ (енолимин)	3,54	28,53	350,5	0,57	3,65	1,45	0,02	7
	IV ¹ (кетонамин)	3,74	30,14	331,8	0,57	3,68	1,22	0,02	10
	III ^{1⊥} (енолимин)	3,80	30,64	326,4	1,11	3,53	1,36	0,03	10
	V ^{1⊥}	3,96	31,92	313,3	0,69	3,47	1,47	0,02	8
	V ^{2*}	4,40	35,49	281,8	7,40	4,78	1,32	0,31	
	*	4,44	35,81	279,3	23,80	4,30	1,56	0,92	

Примечание. * Экспериментальная информация об этих полосах недостаточна.

Надстрочные индексы (1, 2) относятся к первому и второму электронным переходам структуры V. Надстрочный индекс (z) относится к конформеру структуры V, у которого альдиминная группа частично выведена из сопряжения с пиридиновым циклом, но сохраняется водородная связь между альдиминным атомом азота и окси группой кофермента. Надстрочный индекс (⊥) относится к конформерам структур III и V, у которых альдиминная группа полностью выведена из сопряжения с пиридиновым циклом и находится в плоскости, перпендикулярной плоскости пиридинового цикла.

E – энергия электронного перехода; ν – волновое число; λ – длина волны; ϵ – коэффициент молярного поглощения; W – полуширина; ρ – асимметрия; f – сила осциллятора; n % – содержание таутомеров и конформеров, соответствующее содержанию ПЛФ в растворах мутантных ферментов: Tyr107Phe, Tyr107Ala, Tyr52Phe, Tyr52Ala – 60%, 48%, 63%, 71% соответственно.

иона к β, γ -ненасыщенному кетимину и последующий перенос протонов приводят к образованию второго хиноидного интермедиата, C- α -положение которого протонируется с образованием продукта. Протекание реакции должно обеспечиваться путем вовлечения каталитического основания на стадиях отрыва C- α - и C- β -протонов субстрата и кислотного

катализа на стадии элиминирования γ -заместителя.

Замена остатков Tyr52 и Tyr107 существенно повлияла на ионное состояние кофермента в активном центре, что отразилось на эффективности катализа реакции γ -замещения. Снижение эффективности катализа реакции (k_{cat}/K_m) мутантными формами Tyr52Phe

и Tyr52Ala более чем на три порядка является главным образом результатом уменьшения скорости реакции, а также снижения сродства мутантных форм фермента к субстрату (табл. 2). Скорость обмена C- α -протона в комплексах мутантных форм фермента с субстратом уменьшилась по сравнению с ферментом дикого типа (табл. 2). В метионин- γ -лиазе гомологичный остаток Tyr58 обеспечивает оптимальное положение каталитического остатка Lys210 на стадии отрыва C- α -протона [16]. Полученные данные могут свидетельствовать о сходной роли остатка Tyr52 в ОАHS.

Поскольку мутантные формы Tyr107Phe и Tyr107Ala не катализируют образование гомоцистеина в реакции γ -замещения, но катализируют обмен C- α -протона ОАН на дейтерий, мы предполагаем, что остаток Tyr107 может выполнять функцию кислотного катализатора

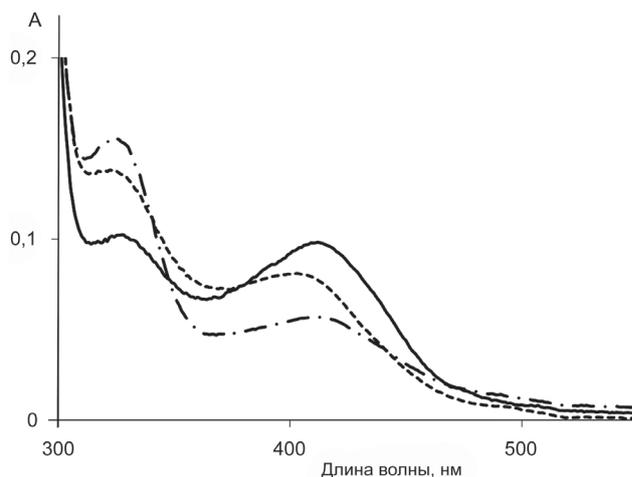


Рис. 4. Спектры поглощения комплексов Tyr52Ala мутантной формы ОАHS с ингибиторами в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,5). Холофермент – непрерывная линия, комплекс с L-метионином – штриховая линия, комплекс с D, L-пропаргилглицином – пунктирная линия

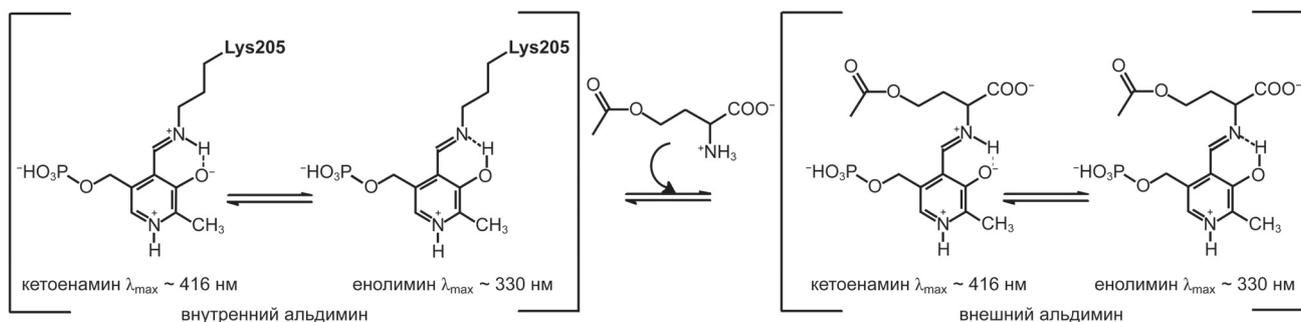


Рис. 5. Равновесие таутомерных форм внутреннего и внешнего альдименов ОАHS

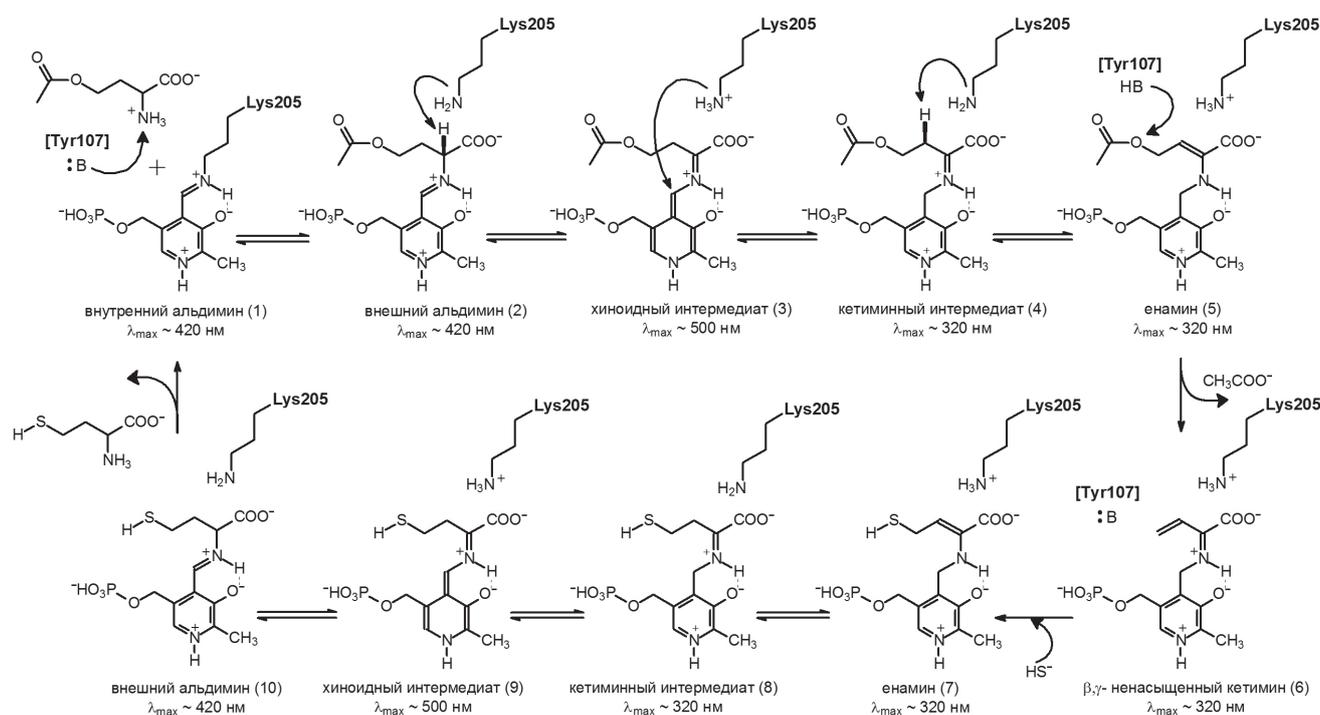


Рис. 6. Предполагаемый механизм реакции γ -замещения, катализируемой ОАHS, согласно данным Brzović et al. [24]

на стадии элиминирования ацетата в OASH из *C. difficile*. Наши данные согласуются с выводами, сделанными для этого консервативного остатка в ферментах подкласса цистатионин- β -лиазы, в которых он был предложен в качестве общего кислотного катализатора на стадии элиминирования заместителя [14, 15, 25]. Помимо того, что стэкинг-взаимодействие ароматической группы остатка Tyr107 с пиридиновым кольцом ПЛФ обеспечивает стабилизацию положения кофермента в активном центре, дестабилизация кофактора при заменах Tyr107 привела, как свидетельствуют данные разложения спектра поглощения холофермента мутантной формы, к нарушению водородной связи пиридинового атома азота ПЛФ с боковой группой Asp180, которая обеспечивает электроноакцепторные свойства кофермента. Данный остаток Asp является строго консервативным в ПЛФ-зависимых ферментах структурного класса I и играет ключевую роль в стабилизации положительного заряда атома азота пиридинового кольца, что увеличивает отток электронов во внешнем и внутреннем альдимидах к атому азота пиридинового фрагмента кофермента. Нарушение связи карбоксильной группы Asp с N1-атомом ПЛФ должно приводить к понижению нуклеофильности C4'-атома внутреннего и внешнего альдиминов и, следовательно, к замедлению стадии трансальдиминирования и уменьшению кислотности C- α -протона внешнего альдимида, образуемых мутантными формами Tyr107Ala и Tyr107Phe.

Влияние замены остатков тирозина на связывание кофактора. Значения K_d , полученные для мутантных форм Tyr52Ala и Tyr52Phe, оказались на три порядка выше, чем для фермента дикого типа (табл. 3). Уменьшение сродства к кофактору соответствует разнице $\sim 4,5$ ккал/моль в свободной энергии связывания ПЛФ между мутантными формами и ферментом дикого типа (табл. 3). Эта величина соответствует энергии водородной связи между заряженным и нейтральными атомами [26], то есть между анионом фосфатной группы кофермента и гидроксильной группой остатка Tyr52 OASH.

В мутантных формах Tyr107Ala и Tyr107Phe сродство к кофактору также уменьшилось на три порядка по сравнению с ферментом дикого типа, значения ΔG снизились на 4,1–4,2 ккал/моль (табл. 3). Такая значительная разница в свободной энергии по сравнению с ферментом дикого типа может объясняться отсутствием водородной связи между атомом азота пиридинового кольца кофактора и карбоксильной группой остатка Asp180. Отсутствие водородной связи и электростатического взаимодей-

ствия консервативного в ферментах структурного класса I остатка аспарагиновой кислоты с положительно заряженным атомом азота пиридинового кольца кофермента в мутантных формах тирозин-фенол-лиазы и аспаратамино-трансферазы с заменой аспарагиновой кислоты также приводило к значительному снижению сродства кофактора с аналогичной разницей в свободной энергии связывания [27, 28]. Аналогичная замена Tyr114 на Phe в C-S-лиазе из *Corynebacterium diphtheriae* вызвала только 16-кратное снижение сродства к ПЛФ (разница в свободной энергии – 1,6 ккал/моль), что позволило авторам сделать предположение о незначительном влиянии данной замены на стэкинг с пиридиновым фрагментом кофактора [29]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что остатки Tyr52 и Tyr107 стабилизируют положение кофактора в активном центре OASH из *C. difficile*.

Таким образом, замена одной аминокислоты во всех четырех мутантных формах, вероятно, не привела к кардинальному изменению общей структуры фермента, что следует из данных по обмену C- α -протона, показавших, что образуется комплекс мутантных форм фермента с субстратом. В пользу данного утверждения свидетельствуют также спектры поглощения мутантных форм с аналогами субстрата. На основании полученных данных было сделано предположение, что остаток Tyr52 участвует в обеспечении оптимального положения каталитического кофактор-связывающего остатка лизина на стадиях отрыва C- α -протона и элиминирования боковой группы субстрата, а остаток Tyr107 может выполнять роль общего кислотного катализатора на стадии элиминирования ацетата.

Вклад авторов. В.В. Куликова проводила кинетические и спектральные исследования, писала статью; С.В. Ревтович выделяла ферменты; А.Д. Лыфенко выращивала биомассу; Е.А. Морозова делала мутагенез; В.С. Коваль проводил исследования реакции изотопного обмена; Н.П. Бажулина анализировала спектры методом логнормального разложения; Т.В. Демидкина координировала все работы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00255).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kulikova, V. V., Anufrieva, N. V., Kotlov, M. I., Morozova, E. A., Koval, V. S., Belyi, Y. F., Revtovich, S. V., and Demidkina, T. V. (2021) *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase from *Clostridium novyi*. Cloning, expression of the gene and characterization of the enzyme, *Protein Expr. Purif.*, **180**, 105810, doi: 10.1016/j.pep.2020.105810.
- Kulikova, V. V., Revtovich, S. V., Bazhulina, N. P., Anufrieva, N. V., Kotlov, M. I., Koval, V. S., Morozova, E. A., Hayashi, H., Belyi, Y. F., and Demidkina, T. V. (2019) Identification of *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase, a putative enzyme responsible for methionine biosynthesis in *Clostridioides difficile*: Gene cloning and biochemical characterizations, *IUBMB Life*, **71**, 1815-1823, doi: 10.1002/iub.2139.
- Kerr, D. S. (1971) *O*-Acetylhomoserine sulfhydrylase from *Neurospora*. Purification and consideration of its function in homocysteine and methionine synthesis, *J. Biol. Chem.*, **246**, 95-102, doi: 10.1016/S0021-9258(18)62537-2.
- Yamagata, S. (1971) Homocysteine synthesis in yeast. Partial purification and properties of *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase, *J. Biochem.*, **70**, 1035-1045, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129712.
- Murooka, Y., Kakihara, K., Miwa, T., Seto, K., and Harada, T. (1977) *O*-alkylhomoserine synthesis catalyzed by *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase in microorganisms, *J. Bacteriol.*, **130**, 62-73, doi: 10.1128/jb.130.1.62-73.1977.
- Lee, H., and Hwang, B. (2003) Methionine biosynthesis and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*: parallel pathways of transsulfuration and direct sulfhydrylation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 459-467, doi: 10.1007/s00253-003-1306-7.
- Fogliano, M., Borne, F., Bally, M., Ball, G., and Patte, J. (1995) A direct sulfhydrylation pathway is used for methionine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology*, **141**, 431-439, doi: 10.1099/13500872-141-2-431.
- Belfaiza, J., Martel, A., Margarita, D., and Saint Girons, I. (1998) Direct sulfhydrylation for methionine biosynthesis in *Leptospira meyeri*, *J. Bacteriol.*, **180**, 250-255, doi: 10.1128/jb.180.2.250-255.
- Shimizu, H., Yamagata, S., Masui, R., Inoue, Y., Shibata, T., Yokoyama, S., Kuramitsu, S., and Iwama, T. (2001) Cloning and overexpression of the *oah1* gene encoding *O*-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase of *Thermus thermophilus* HB8 and characterization of the gene product, *Biochim. Biophys. Acta*, **1549**, 61-72, doi: 10.1016/S0167-4838(01)00245-x.
- Krishnamoorthy, K., and Begley, T.P. (2011) Protein thiocarboxylate-dependent methionine biosynthesis in *Wolinella succinogenes*, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 379-386, doi: 10.1021/ja107424t.
- Tran, T. H., Krishnamoorthy, K., Begley, T. P., and Ealick, S. E. (2011) A novel mechanism of sulfur transfer catalyzed by *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase in the methionine-biosynthetic pathway of *Wolinella succinogenes*, *Acta Cryst.*, **D67**, 831-838, doi: 10.1107/S0907444911028010.
- Brewster, J. L., Pachel, P., McKellar, J. L., Selmer, M., Squire, C. J., and Patrick, W. M. (2021) Structures and kinetics of *Thermotoga maritima* MetY reveal new insights into the predominant sulfurylation enzyme of bacterial methionine biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100797, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100797.
- Messerschmidt, A., Worbs, M., Steegborn, C., Wahl, M. C., Huber, R., Laber, B., and Clausen, T. (2003) Determinants of enzymatic specificity in the Cys-Met-metabolism PLP-dependent enzymes family: crystal structure of cystathionine γ -lyase from yeast and intrafamilial structure comparison, *Biol. Chem.*, **384**, 373-386, doi: 10.1515/BC.2003.043.
- Inoue, H., Inagaki, K., Adachi, N., Tamura, T., Esaki, N., Soda, K., and Tanaka, H. (2000) Role of tyrosine 114 of L-methionine gamma-lyase from *Pseudomonas putida*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2336-2343, doi: 10.1271/bbb.64.2336.
- Revtovich, S. V., Faleev, N. G., Morozova, E. A., Anufrieva, N. V., Nikulin, A. D., and Demidkina, T. V. (2014) Crystal structure of the external aldimine of *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase with glycine provides insight in mechanisms of two stages of physiological reaction and isotope exchange of α - and β -protons of competitive inhibitors, *Biochimie*, **101**, 161-167, doi: 10.1016/j.biochi.2014.01.007.
- Anufrieva, N. V., Faleev, N. G., Morozova, E. A., Bazhulina, N. P., Revtovich, S. V., Timofeev, V. P., Tkachev, Y. V., Nikulin, A. D., and Demidkina, T. V. (2015) The role of active site tyrosine 58 in *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1854**, 1220-1228, doi: 10.1016/j.bbapap.2014.12.027.
- 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, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
- Kredich, N. M., and Becker, M. A. (1971) Cysteine biosynthesis: serine transacetylase and *O*-acetylserine sulfhydrylase, *Methods Enzymol.*, **17 B**, 459-470, doi: 10.1016/0076-6879(71)17082-6.
- Peterson, E. A., and Sober, H. A. (1954) Preparation of crystalline phosphorylated derivatives of vitamin B6, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 169-175, doi: 10.1021/ja01630a045.

21. Bazhulina, N. P., Morozov, Y. V., Papisova, A. I., and Demidkina, T. V. (2000) Pyridoxal 5'-phosphate Schiff base in *Citrobacter freundii* tyrosine phenol-lyase. Ionic and tautomeric equilibria, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1830-1836, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01185.x.
22. Scatchard, G. (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions, *Ann. NY Acad. Sci.*, **51**, 660-672, doi: 10.1111/j.1749-6632.1949.tb27297.x.
23. Käck, H., Sandmark, J., Gibson, K., Schneider, G., and Lindqvist, Y. (1999) Crystal structure of diaminopelargonic acid synthase: evolutionary relationships between pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes, *J. Mol. Biol.*, **291**, 857-876, doi: 10.1006/jmbi.1999.2997.
24. Brzović, P., Holbrook, E. L., Greene, R. C., and Dunn, M. F. (1990) Reaction mechanism of *Escherichia coli* cystathionine gamma-synthase: direct evidence for a pyridoxamine derivative of vinylglyoxylate as a key intermediate in pyridoxal phosphate dependent gamma-elimination and gamma-replacement reactions, *Biochemistry*, **29**, 442-451, doi: 10.1021/bi00454a020.
25. Steegborn, C., Laber, B., Messerschmidt, A., Huber, R., and Clausen, T. (2001) Crystal structures of cystathionine γ -synthase inhibitor complexes rationalize the increased affinity of a novel inhibitor, *J. Mol. Biol.*, **311**, 789-801, doi: 10.1006/jmbi.2001.4880.
26. Fersht, A. R., Shi, J. P., Knill-Jones, J., Lowe, D. M., Wilkinson, A. J., Blow, D. M., Brick, P., Carter, P., Waye, M. M., and Winter, G. (1985) Hydrogen bonding and biological specificity analysed by protein engineering, *Nature*, **314**, 235-238, doi: 10.1038/314235a0.
27. Yano, T., Kuramitsu, S., Tanase, S., Morino, Y., and Kagamiyama, H. (1992) Role of Asp222 in the catalytic mechanism of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase: the amino acid residue which enhances the function of the enzyme-bound coenzyme pyridoxal 5'-phosphate, *Biochemistry*, **31**, 5878-5887, doi: 10.1021/bi00140a025.
28. Demidkina, T. V., Faleev, N.G., Papisova, A. I., Bazhulina, N. P., Kulikova, V. V., Gollnick, P.D., and Phillips, R. S. (2006) Aspartic acid 214 in *Citrobacter freundii* tyrosine phenol-lyase ensures sufficient C-H-acidity of the external aldimine intermediate and proper orientation of the cofactor at the active site, *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 1268-1276, doi: 10.1016/j.bbapap.2006.05.001.
29. Astegno, A., Allegrini, A., Piccoli, S., Giorgetti, A., and Dominici, P. (2015) Role of active-site residues Tyr55 and Tyr114 in catalysis and substrate specificity of *Corynebacterium diphtheriae* C-S lyase, *Proteins*, **83**, 78-90, doi: 10.1002/prot.24707.

***O*-ACETYLMOMOSERINE SULFHYDRYLASE FROM *Clostridioides difficile*: THE ROLE OF TYROSINE RESIDUES OF THE ACTIVE CENTER**

**V. V. Kulikova*, S. V. Revtovich, A. D. Lyfenko, E. A. Morozova,
V. S. Koval, N. P. Bazhulina, and T. V. Demidkina**

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia; e-mail: vitviku@yandex.ru*

O-acetylhomoserine sulfhydrylase is one of the key enzymes in the biosynthesis of methionine in *Clostridioides difficile*. The mechanism of the γ -substitution reaction of *O*-acetyl-L-homoserine catalyzed by this enzyme is the least studied among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes involved in the metabolism of cysteine and methionine. To clarify the role of the active site residues Tyr52 and Tyr107, four mutant forms of the enzyme with replacements for phenylalanine and alanine were obtained. The catalytic and spectral properties of mutant forms were investigated. The rate of the γ -substitution reaction catalyzed by mutant forms with the replacement of the Tyr52 residue decreased by more than three orders of magnitude compared to the wild-type enzyme. Tyr107Phe and Tyr107Ala mutant forms practically did not catalyze this reaction. Replacements of the residues Tyr52 and Tyr107 led to a decrease in the affinity of the apoenzyme to the coenzyme by three orders of magnitude and changes in the ionic state of the internal aldimine of the enzyme. The obtained results allowed us to assume that Tyr52 is involved in ensuring the optimal position of the catalytic coenzyme-binding lysine residue at the stages of C- α -proton elimination and elimination of the side group of the substrate. Tyr107 can act as a general acid catalyst at the stage of acetate elimination.

Keywords: *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase, pyridoxal-5'-phosphate, γ -substitution reaction, site-directed mutagenesis