

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

ПОИСК УСЛОВИЙ, СПОСОБСТВУЮЩИХ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ ОЛИГОПЕПТИДАЗЫ В ИЗ *Serratia proteamaculans*, МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ ФЛУОРИМЕТРИИ

© 2020 г. Д. Е. Петренко^{1,*}, А. Ю. Николаева¹, В. А. Лазаренко¹, П. В. Дороватовский¹,
В. И. Тимофеев^{1,2}, А. В. Власкина¹, Д. А. Корженевский¹, А. Г. Михайлова³, Т. В. Ракитина^{1,3,**}

¹ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

² Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

³ Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

* E-mail: dmitry.e.petrenko@gmail.com

** E-mail: taniarakitina@yahoo.com

Поступила в редакцию 22.02.2019 г.

После доработки 22.02.2019 г.

Принята к публикации 28.03.2019 г.

Олигопептидазы В (OpdBs) — это двухдоменные сериновые пептидазы с трипсиноподобной субстратной специфичностью, принадлежащие семейству пролилолигопептидаз. OpdBs относятся к факторам патогенеза трипаносомозов, лейшманиозов и других паразитарных, а в ряде случаев и бактериальных инфекций, и являются потенциальными мишенями для разработки терапевтических противоинфекционных средств. На сегодняшний день определены только две пространственные структуры ферментов данного класса, обе для OpdBs простейших; ни одной структуры OpdBs из бактерий пока не получено. Для увеличения результативности поиска условий кристаллизации OpdB бактерии *Serratia proteamaculans* (PSP) успешно использован метод дифференциальной сканирующей флуориметрии (термофлуор). Установлено, что низкомолекулярные полиамины способны стабилизировать PSP в растворе. С кристалла PSP, выращенного в присутствии спермина методом диффузии в парах, на источнике синхротронного излучения НИЦ “Курчатовский институт” собран рентгенодифракционный набор до разрешения 1.88 Å.

DOI: 10.31857/S0023476120020186

ВВЕДЕНИЕ

Олигопептидазы В (OpdBs) представляют собой сериновые пептидазы с трипсиноподобной субстратной специфичностью [КФ 3.4.21.83], принадлежащие семейству пролилолигопептидаз (РОР), характерной особенностью которого является наличие N-концевого регуляторного β-пропеллерного домена и C-концевого α/β-гидролазного каталитического домена [1]. OpdBs или кодирующие их гены обнаружены в прокариотах, одноклеточных эукариотах и некоторых высших растениях [2]. Установлено, что эти ферменты относятся к факторам патогенеза трипаносомозов, лейшманиозов и других паразитарных, а в ряде случаев и бактериальных инфекций, и являются потенциальными мишенями для разработки терапевтических противоинфекционных средств [3].

К настоящему моменту получены только трехмерные структуры протозойных OpdBs из лейшмании *Leishmania major* и трипаносомы *Trypanosoma brucei*, которые продемонстрировали, что помимо аминокислотных остатков триады актив-

ного центра и первичного субстратсвязывающего центра функционирование OpdBs определяется наличием пяти междоменных солевых мостов [4, 5]. Однако консервативные в протозойных OpdBs заряженные аминокислотные остатки междоменного интерфейса, участвующие в образовании четырех из пяти функционально важных солевых мостов, не являются консервативными в большинстве бактериальных ферментов, что указывает на существование различных механизмов активации у OpdBs бактерий и простейших [6]. Поиск альтернативных структурных мотивов, регулирующих каталитическую активность OpdBs бактерий, затруднен отсутствием пространственных структур этих ферментов.

Цель настоящей работы — поиск условий кристаллизации и получение кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа (РСА) олигопептидазы В из психрофильной бактерии *Serratia proteamaculans* (PSP) [7, 8]. Рекомбинантная PSP была получена в системе экспрессии *Escherichia coli* и функционально охарактеризована [9–12],

однако получить пригодные для PCA кристаллы длительное время не удавалось. С целью решения этой проблемы был использован метод термофлуор, представляющий собой разновидность дифференциальной сканирующей флуориметрии и позволяющий быстро анализировать стабильность водорастворимых белков в различных средах [13, 14].

В результате исследований установлено, что термостабильность PSP увеличивается в присутствии низкомолекулярных полиаминов. Кристаллы PSP, выращенные в присутствии спермина, были использованы для PCA, проведенного на синхротронном источнике НИЦ “Курчатовский институт”. Собранный набор дифракционных данных обработан до разрешения 1.88 Å.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и очистка белка. Рекомбинантная PSP, содержащая N-концевой полигистидиновый таг, была получена с помощью металлохелатной афинной хроматографии, проводимой на Ni-NTA, как описано в [6, 10–12]. Для концентрирования белка использовали приборы для ультрафильтрации Centricon (Merck-Millipore, США). Для проверки чистоты препарата проведен ДСН-ПААГ-электрофорез с использованием ячейки для электрофореза Mini-Protean 3 (Bio-Rad, США). Концентрация разделяющего геля составляла 10–12%, концентрирующего – 4%. Гели окрашивали с помощью Coomassie G-250. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда с помощью реактива Bio-Rad Protein Assay и стандарта БСА (бычий сывороточный альбумин).

Дифференциальная сканирующая флуориметрия (термофлуор). Реакционная смесь для поиска условий, стабилизирующих PSP, содержала белок с концентрацией 0.5 мг/мл и 5-кратный краситель SYPRO Orange (λ_{ex} – 300 и 470 нм, λ_{em} – 570 нм) (Sigma-Aldrich, США) в буферных растворах, различающихся pH, ионной силой, вязкостью, присутствием различных двухвалентных катионов, детергентов или лигандов из набора Silver Bullet (Hampton Research). Реакционную смесь раскпывали в 96-луночные планшеты для полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР); в качестве контроля использовали реакционные смеси без белка. Каждое условие анализировали в трех повторах. Кривые плавления снимали на РВ-амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) в режиме FRET в диапазоне температур от 25 до 65°C с интервалом 1°C. Обработку полученных данных проводили с использованием программы GraphPad Prism 8.0. Для построения кривых плавления из усредненных значений флуоресценции образцов, содержащих белок, вычитали усредненные значения флуоресценции

контрольных замеров. Значения, выходящие за пределы S-образной области, обрезали, а кривые аппроксимировали в соответствии с уравнением Больцмановской кривой плавления [15]. Температуру плавления находили как значение температуры, при которой флуоресценция достигает половины максимального значения, что соответствует перегибу кривой плавления.

Поиск условий кристаллизации и выращивание кристаллов. Поиск условий кристаллизации PSP проводили методом “сидячей капли” посредством диффузии в парах в 96-луночных пластиковых планшетах Intelli-plate LowProfile (Art Robbins, США) при температурах +20 и +4°C. Использовали роботизированную систему кристаллизации “Rigaku” (Япония) РЦ МКБ НИЦ “Курчатовский институт” и стандартные наборы для скрининга условий кристаллизации глобулярных белков: Crystal Screen HT, Index HT, PEG/Ion HT, PEGRx HT, TOP-96 (Hampton Research и Anatrace). Оптимизацию найденных условий проводили методом “висячей капли” посредством диффузии в парах в 24-луночных планшетах (Linbro). В ходе оптимизации варьировали концентрацию белка и осадителя, pH и ионную силу буферных растворов. Кристаллы, пригодные для проведения PCA, были выращены в течение 7 дней при +4°C в условиях 200 mM Lithium sulfate, 100 mM Bis-Tris, pH 5.5, 23% PEG 3350.

Сбор и обработка дифракционных данных. Сбор дифракционных данных был проведен на станции Белок ($\lambda = 0.787$ Å) Курчатовского источника синхротронного излучения. Эксперимент проводили при температуре 100 К в прямой геометрии ($\theta = 0^\circ$). Кристалл находился в криопетле, в качестве криопротектора использовали раствор с добавлением 25% глицерина. Было собрано 350 дифракционных картин с шагом в 1° , расстояние образец–детектор 140 мм. Картины дифракции детектировались с помощью двумерного детектора Rayonix MARCCD.

Данные были проиндексированы и проинтегрированы с помощью программы iMosflm из пакета CCP4 [16]. Статистика набора данных приведена в табл. 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на значительные успехи структурной биологии, кристаллизация белков все еще остается “наукой на грани искусства”. Объект данного исследования олигопептидаза В из *S. proteamaculans* – двухдоменный психрофильный фермент, плохо поддавался кристаллизации. Причиной этого могло быть постоянное движение доменов друг относительно друга, происходящее при переходе молекулы из открытой неактивной формы в закрытую активную и обратно,

что описано в литературе для ферментов данного класса [5].

Чтобы найти условия, способствующие стабилизации и соответственно кристаллизации PSP, использовали метод термофлуор, представляющий собой разновидность дифференциальной сканирующей флуориметрии [13]. Данный метод позволяет быстро анализировать стабильность белков в растворах разного состава. Он основан на добавлении в водный раствор белка термостабильных флуоресцентных красителей, способных неспецифически связываться с гидрофобной поверхностью белка. При постепенном повышении температуры тепловая денатурация белка приводит к разворачиванию гидрофобного ядра, которое становится доступным молекулам красителя. При связывании красителя с гидрофобным ядром гашение флуоресценции снимается молекулами воды, и квантовый выход флуоресценции резко возрастает, что определяется РВ-амплификатором. Полученная кривая тепловой денатурации позволяет рассчитать температуру плавления белковой глобулы, являющуюся одним из показателей стабильности белка. Сдвиг температуры плавления при различных значениях рН, ионной силы, вязкости или в присутствии каких-либо добавок позволяет найти факторы, способствующие стабилизации белковой глобулы. Увеличение стабильности белка способствует повышению результативности структурных исследований, таких как РСА или гетероядерная спектроскопия ядерного магнитного резонанса высокого разрешения [13, 14].

В табл. 2 представлены все условия, при которых была исследована термостабильность PSP. В табл. 3 представлены три условия, при которых наблюдалось повышение температуры плавления PSP по сравнению с контрольным экспериментом, а на рис. 1 – результаты термофлуориметрии PSP в этих же условиях. Как видно из табл. 3, согласно результатам дифференциальной сканирующей флуориметрии температура плавления ($T_{пл}$) PSP была около 40°C, что коррелировало с данными по тепловой денатурации фермента, полученными ранее [9, 11, 17]. В трех найденных условиях $T_{пл}$ поднималась более чем на 2°C. Сравнительный анализ этих условий показал, что во всех случаях повышение температуры плавления белковой глобулы происходило в присутствии низкомолекулярных полиаминов, к которым относятся спермин, спермидин, цистамин, кадаверин и хлорид гексаамминкобальта(III). Известно, что эти полиамины широко используются для получения кристаллов нуклеиновых кислот, что связано с их способностью нейтрализовать отрицательно заряженные фосфатные группы, большое количество которых на поверхности молекул препятствует кристаллизации [18].

Таблица 1. Кристаллографические данные и параметры съемки кристалла PSP

| | |
|---|---------------------------|
| Пространственная группа | $P2_12_12_1$ |
| $a, b, c, \text{Å}; \alpha = \beta = \gamma, \text{град}$ | 70.74, 100.44, 108.72; 90 |
| $T, \text{К}$ | 100 |
| $\lambda, \text{Å}$ | 0.787 |
| Разрешение, Å | 30.00–1.88 (2.00–1.88)* |
| Число независимых рефлексов | 121031 (19557) |
| Повторяемость | 7.07 (7.08) |
| Полнота набора, % | 99.9 (99.7) |
| $I/\sigma(I)$ | 20.52 (4.59) |
| Rmrgd-F, % | 6.1 (44.6) |

* В скобках приведены значения для последнего слоя.

Наблюдаемая стабилизация PSP в присутствии полиаминов скорее всего тоже связана с нивелированием отрицательных зарядов на поверхности белка положительно заряженными аминокислотными группами, что в свою очередь должно способствовать образованию стабильных кристаллических контактов. Поэтому дальнейшую кристаллизацию PSP проводили в присутствии полиамина – спермина (рис. 2).

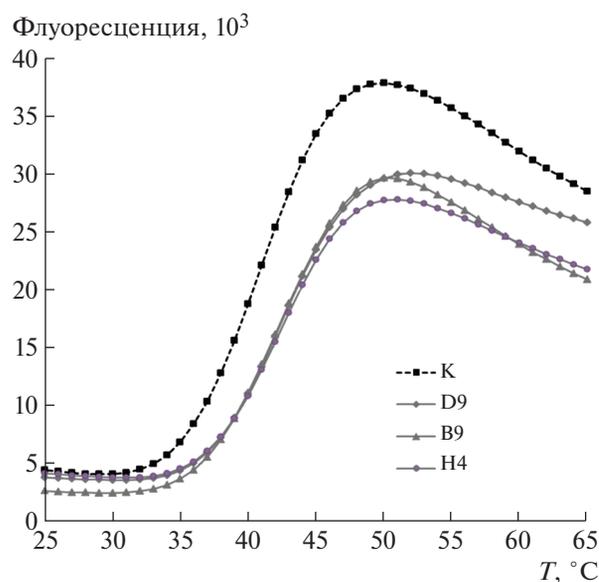


Рис. 1. Изменение кривой плавления PSP в присутствии низкомолекулярных полиаминов, определенное методом термофлуор. Серые линии – кривые плавления PSP в присутствии растворов D9, H4, B9 из набора Silver Bullets (табл. 3). Черная линия – контрольная кривая плавления PSP. Приведены средние значения по трем независимым экспериментам.

Таблица 2. Поиск факторов, стабилизирующих PSP в растворе

| Условия, в которых анализировали стабильность PSP методом термофлуор | | Результаты |
|--|---|------------|
| Изменяемые параметры реакционной смеси | Используемые буферы, соли и другие добавки | |
| рН | 5.5 (Citrate Na), 6.5 (Cacodylate Na), 7.5 (HEPES), 8.0 и 9.0 (TrisHCl) | —* |
| Ионная сила | NaCl – 0.1 и 0.75 М | —* |
| Двух валентные катионы | CaCl ₂ – 0.5 и 1 М, MgSO ₄ – 0.5 и 1.5 М | —* |
| Детергенты | CHAPS – 0.5%, октилглюкопиранозид – 1 и 5%, Тритон X100 – 5% | —* |
| Вязкость раствора | Глицерин – 5 и 10%, сахароза – 50 и 200 мМ | —* |
| Специальные добавки | Набор Silver Bullet (Hampton Research), 96 условий | +** |

* Термостабильность не увеличивается.

** Термостабильность увеличивается в присутствии полиаминов (табл. 3).

Таблица 3. Условия, повышающие термостабильность PSP

| Код раствора в наборе Silver Bullets | Состав раствора | $T_{пл}$ PSP, °C |
|--------------------------------------|---|------------------|
| Контроль | Без добавок | 40.08 ± 0.04 |
| D9 | 1,2-Диаминоциклогексана сульфат, 4-нитробензойная кислота, цистаминадигидрохлорид, спермин, ХЕПЕС, рН 6.8 | 42.05 ± 0.05 |
| H4 | 1,4-Диаминобутан, 1,8-диаминооктан, кадаверин, цистамина дигидрохлорид, спермидин, спермин, ХЕПЕСрН, 6.8 | 42.71 ± 0.07 |
| B9 | Хлорид гексаамминкобальта(III), салициламид, сульфаниламид, ванилиновая кислота, ХЕПЕС, рН 6.8 | 42.37 ± 0.12 |

Кристалл PSP, выращенный в присутствии спермина, представлен на рис. 3. Кристалл использовали для РСА, проведенного на станции Белок синхротронного источника НИЦ “Курчатовский институт”. Кристалл принадлежал пр. гр. $P2_12_12_1$ с параметрами ячейки: $a = 70.74$, $b = 100.44$, $c = 108.72$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ (табл. 1). Собранный набор дифракционных данных позволяет определить структуру фермента с разрешением 1.88 Å.

В заключение отметим, что в результате подбора условий, способствующих стабилизации белка в растворе, с помощью метода дифференциальной сканирующей флуориметрии (термо-

флуор) впервые удалось получить кристаллы бактериальной олигопептидазы В, пригодные для РСА.

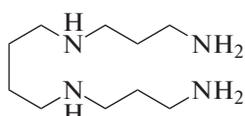


Рис. 2. Химическая формула спермина – N,N'-бис(3-аминопропил)бутан-1,4-диамина.



Рис. 3. Фотография кристалла PSP, выросшего в присутствии 5 мМ спермина, полученная с помощью стереомикроскопа Nikon SZM 1000.

Работы по дифференциальной сканирующей флуориметрии и рентгенокристаллографии PSP выполнены при поддержке Российского научного фонда (соглашение № 17-14-01256). Протокол проведения термофлуориметрических экспериментов был предварительно разработан при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fulop V., Bocskai Z., Polgar L.* // Cell. 1998. V. 94. P. 161.
2. *Kaushik S., Sowdhamini R.* // BMC Genomics. 2014. V. 15. P. 985.
3. *Coetzer T.H., Goldring J.P., Huson L.E.* // Biochimie. 2008. V. 90. P. 336.
4. *McLuskey K., Paterson N.G., Bland N.D. et al.* // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. № 50. P. 39249.
5. *Canning P., Rea D., Morty R.E. et al.* // PloS One. 2013. V. 8. № 11. P. e79349.
6. *Mikhailova A.G., Rakitina T.V., Timofeev V.I. et al.* // Biochimie. 2017. V. 139. P. 125.
7. *Михайлова А.Г., Лихарева В.В., Хайруллин Р.Ф. и др.* // Биохимия. 2006. Т. 71. № 5. С. 697.
8. *Хайруллин Р.Ф., Михайлова А.Г., Себякина Т.Ю. и др.* // Биохимия. 2009. Т. 74. № 10. С. 1427.
9. *Михайлова А.Г., Хайруллин Р.Ф., Демидюк И.В. и др.* // Биохимия. 2011. Т. 76. № 4. С. 591.
10. *Михайлова А.Г., Хайруллин Р.Ф., Коломийцева Г.Я. и др.* // Биохимия. 2012. Т. 77. № 3. С. 384.
11. *Mikhailova A.G., Khairullin R.F., Demidyuk I.V. et al.* // Protein Exp. Purif. 2014. V. 93. P. 63.
12. *Михайлова А.Г., Некрасов А.Н., Зинченко А.А. и др.* // Биохимия. 2015. Т. 80. № 11. С. 1606.
13. *Ericsson U.B., Hallberg B.M., Detitta G.T. et al.* // Anal. Biochem. 2006. V. 357(2). P. 289.
14. *Kozak S., Lercher L., Karanth M.N. et al.* // J. Biomol. NMR. 2016. V. 64(4). P. 281.
15. *Kathy H., Carrie L.P.* // Current Protocols in Protein Science. 2017. V. 79. P. 28.9.1.
16. *Winn M.D., Ballard C.C., Cowtan K.D. et al.* // Acta Cryst. 2011. V. 67(4). P. 235.
17. *Ovchinnikova M.V., Mikhailova A.G., Karlinsky D.M. et al.* // Acta Naturae. 2018. V. 10(2). P. 65.
18. *Krauss I.R., Merlino A., Vergara A. et al.* // J. Mol. Sci. 2013. V. 14. P. 11643.