

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ТРАНСАМИНАЗЫ РАЗВЕТВЛЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ ИЗ *Thermoproteus uzoniensis* В КОМПЛЕКСЕ С L-НОРВАЛИНОМ

© 2020 г. К. М. Бойко^{1,*}, А. Ю. Николаева², В. И. Тимофеев^{2,3}, В. О. Попов^{1,2}, Е. Ю. Безсуднова¹

¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия

²Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

³Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

*E-mail: kmb@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 16.10.2019 г.

После доработки 16.10.2019 г.

Принята к публикации 11.11.2019 г.

Трансаминазы (аминотрансферазы) представляют собой стереоспецифичные ферменты, катализирующие обратимый перенос аминогруппы от различных субстратов. Они являются ключевыми ферментами метаболизма аминокислот во всех организмах и перспективны для использования в тонком органическом синтезе. Среди всего многообразия трансаминаз мало исследованы и очень интересны ферменты, принадлежащие IV типу укладки пиридоксаль-5'-фосфатсвязывающего домена, отличающиеся специфичностью как к D-, так и к L-аминокислотам и (R)-аминам. Исследована кристаллическая структура термостабильной трансаминазы разветвленных аминокислот IV типа укладки из археи *Thermoproteus uzoniensis* в комплексе с неприродным субстратом – L-норвалином. Описан механизм связывания субстрата и ключевые аминокислоты, принимающие в этом участие.

DOI: 10.31857/S0023476120040049

ВВЕДЕНИЕ

Трансаминазы (ТА; аминотрансферазы; EC 2.6.1.) катализируют обратимый стереоселективный перенос аминогруппы с аминсубстрата на кетон/кетокислоту/альдегид с образованием хирального амина/аминокислоты и нового кетосоединения [1]. В клетках всех организмов ТА являются ключевыми ферментами метаболизма аминокислот. Помимо фундаментальной функции ТА находят широкое применение в биотехнологии, в частности в синтезе оптически активных аминов и неприродных аминокислот и в стереоселективном аминировании органических соединений [2–5].

Среди многообразия ТА ферменты, принадлежащие IV типу укладки (суперсемейство D-аланин-трансаминаз), исследованы меньше всего и представлены тремя различными по свойствам и структуре семействами: трансаминазами D-аминокислот (специфичны к D-аминокислотам), трансаминазами разветвленных аминокислот – ВСАТ (специфичны к гидрофобным L-Leu, L-Val и L-Ile) и (R)-амин-трансаминазами (специфичны к R-аминам и кетонам). Недавно были обнаружены ТА смешанного типа (mixed-type ТА) [6–8],

для которых характерна активность, свойственная всем перечисленным выше семействам. Такие ферменты отличаются заменами в консервативных для ТА мотивах активного центра, создающими возможность связывания в одном активном центре различных по строению и заряду субстратов. Указанное свойство делает актуальным поиск таких ферментов в новых геномных библиотеках для последующего создания на их основе биокатализаторов. Особую важность приобретает поиск ТА в термофильных и гипертермофильных организмах, например в археях, так как в данном случае искомым белком заведомо будет обладать повышенной термостабильностью, необходимой при биотехнологическом применении.

Одним из таких ферментов является термостабильная ТА из археи *Thermoproteus uzoniensis* (TUZN1299, EC 2.6.2.42). В [9] была установлена пространственная структура данного фермента с разрешением 2.0 Å и проведена его функциональная характеристика, показавшая высокую термостабильность фермента и необычно широкую для ВСАТ субстратную специфичность. В частности, TUZN1299 был активен как с гидрофобными

Таблица 1. Кристаллографические данные и параметры съемки кристалла комплекса трансминазы TUZN1299 с L-норвалином

Пр. гр.	$P3_112$
$a = b, c, \text{Å}$	93.46, 213.17
$\alpha = \beta, \gamma, \text{град}$	90, 120
$T, \text{К}$	100
$\lambda, \text{Å}$	0.7
Разрешение, Å	80.94–2.15 (2.20–2.15)*
Число независимых рефлексов	58 111 (3766)
Повторяемость	8.2 (8.3)
Полнота набора, %	99.70 (98.20)
$I/\sigma(I)$	23.0 (2.3)
$R_{meas}, \%$	6.8 (118.3)
$CC_{1/2}, \%$	100 (76.1)

* В скобках приведены значения для последнего слоя.

природными разветвленными L-аминокислотами и их линейными аналогами, так и с положительно-заряженными L-аминокислотами.

В настоящей работе получена пространственная структура TUZN1299 в комплексе с неприродным линейным субстратом – L-норвалином, с разрешением 2.15 Å. Анализ структуры позволяет установить преимущественную конформацию лиганда, несмотря на неполную его заселенность, и остатки, принимающие участие в координации L-норвалина. Полученная структура дополняет немногочисленные структурные данные о комплексах ТА с субстратами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Очистка и выделение белка. Получение кристаллов комплекса с L-норвалином. Очистку и выделение TUZN1299 проводили по протоколу, описанному в [9]. Белок концентрировали до 10 мг/мл при помощи концентраторов Millipore для последней кристаллизации.

Кристаллы комплекса TUZN1299 с L-норвалином получали методом настаивания кристаллов холо-формы фермента в 50 мМ растворе субстрата в течение 6–12 ч. Кристаллы холо-фермента получали согласно методике, описанной в [9].

Сбор и обработка дифракционных данных. Решение и уточнение структуры. Перед сбором рентгенодифракционных данных кристаллы вылавливали петлей и переносили в криораствор, содержащий кроме компонентов, входящих в противораствор, 25% глицерина, после чего кристалл в петле замораживали в парах азота. Дифракционные наборы собирали при температуре 100 К на станции

Таблица 2. Данные уточнения комплекса трансминазы TUZN1299 с L-норвалином

$R_{fact}, \%$	18.7
$R_{free}, \%$	23.4
Общий средний B -фактор	48.5
Средний B -фактор по белку	48.5
Средний B -фактор по лигандам	40.6
Средний B -фактор по растворителю	44.3
Число неводородных атомов	
Белок	7011
Лиганды	114
Растворитель	179
Всего	7304
Среднеквадратичные отклонения	
Длины связей, Å	0.020
Валентные углы, град	2.415
График Рамачандрана	
Наиболее благоприятные, %	93.9
Допустимые, %	5.1
Код PDB	6THQ

VL41XU синхротронного источника SPring-8 (Япония). Дифракционная картина фиксировалась детектором Pilatus6M-F. Для расчета стратегии сбора данных использована программа HKL2000 [10], предложившая следующие параметры: длина волны 0.7 Å, угол вращения 144°, угол качания 0.3°, расстояние кристалл–детектор 600 мм. Набор дифракционных данных обработан с использованием программ XDS и XSCALE [11]. Статистика набора данных приведена в табл. 1.

Решение структуры проведено методом молекулярного замещения при помощи программы MOLREP [12]. В качестве стартовой модели использовали установленную ранее структуру холо-формы TUZN1299 (код PDB_ID: 5CE8). Кристаллографическое уточнение структуры проведено с использованием программ Refmac5 [13] и Coot [14] до достижения R -факторами следующих значений: $R_{work} = 18.7$, $R_{free} = 23.4$ (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Кристаллы TUZN1299 принадлежат пр. гр. $P3_112$. В независимой части элементарной ячейки кристалла содержатся три субъединицы белка. При попарном сравнении субъединиц между собой по $C\alpha$ -атомам RMSD не превышает 0.2 Å².

Общая архитектура субъединицы TUZN1299 в комплексе с норвалином не отличается от таковой для холо-формы фермента (PDB_ID: 5CE8),

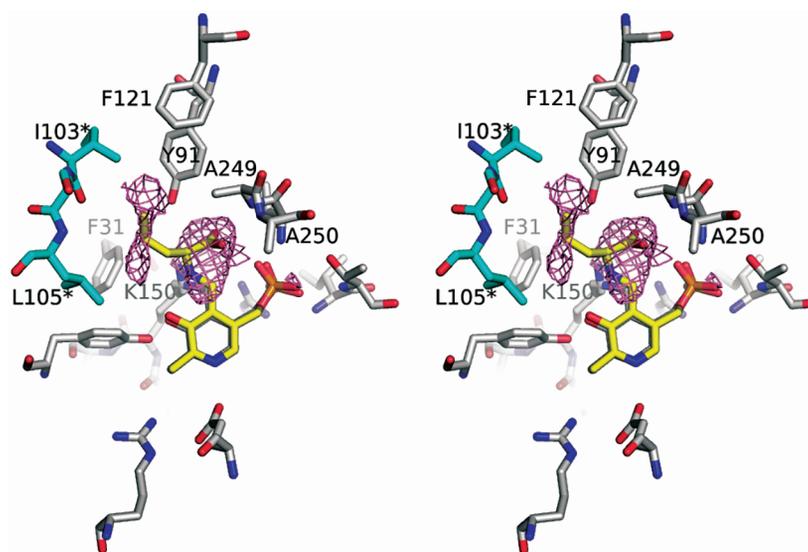


Рис. 1. Стереорепрезентация структуры активного центра ТА TUZN1299. Показана молекула L-норвалина, ковалентно связанная с кофактором. Синтез Fo–Fc показан сетчатой поверхностью (уровень срезаки 3σ).

RMSD не превышает 0.3 \AA^2 . В активном центре фермента находится кофактор — пиридоксаль-фосфат (PLP). Электронная плотность характерных для норвалина размеров обнаружена в каждой из субъединиц независимой части элементарной ячейки с *si*-стороны кофактора в непосредственной близости от него. Проведенный разностный синтез электронной плотности позволил сделать вывод о том, что L-норвалин ковалентно связан с кофактором и вместе они образуют внешний альдимин (рис. 1). Следует отметить, что во всех субъединицах молекула L-норвалина имеет половинную заселенность, что, по-видимому, связано с нефизиологичностью кристаллизационных условий. Наиболее удачным оказалось описание электронной плотности в активном центре TUZN1299 в виде смеси (с половинной заселенностью) ковалентно связанного с норвалином внешнего альдимина и внутреннего альдимина, связанного с каталитическим лизином Lys150. Тем не менее на основании полученных структурных данных можно сделать вывод о том, что основными мотивами, участвующими в координации норвалина, являются следующие (рис. 1): молекула PLP (образуется ковалентная связь между атомом C4 и атомом азота основной цепи норвалина); боковая группа остатка Tyr91; атомы азота основной цепи остатков Ala249 и Ala250 (взаимодействие осуществляется через консервативную молекулу растворителя). Три последних остатка координируют карбоксильную группу субстрата в Р-кармане, при этом его алифатическая группа, находящаяся в О-кармане, никак не фиксирована, что выражается в размытой электронной плотности в этом месте. Последний факт

достаточно логичен, так как известно, что О-карман ВСАТ-трансаминаз ответственен за активность с различными типами субстратов (*substrate promiscuity*) за счет содержания характерных аминокислот для связывания как заряженных, так и гидрофобных групп [1]. В случае с норвалином наличие гидрофобных аминокислот Ile103*, Leu105*, Phe31 и Phe121, по-видимому, способствует связыванию алифатической группы субстрата в О-кармане (звездочка обозначает остатки из второй субъединицы активного димера фермента, активный центр ТА всегда образован остатками от двух субъединиц).

При связывании норвалина происходит поворот плоскости кольца молекулы PLP относительно оси, проходящей через N1- и C6-атомы, в сторону связываемого субстрата (сдвиг между соответствующими C4A-атомами составляет порядка 1.4 \AA). Поворот кольца сопровождается изменением конформации остатков Arg139, Glu184 и Tyr155, при этом ОН-атом последнего, как и в случае холо-формы, имеет короткую водородную связь с атомом O3PLP [9], что характерно и для других ферментов этого класса [6, 8].

Положение и конформация остальных остатков активного центра при связывании субстрата остались неизменными по сравнению со структурой холо-формы фермента (рис. 2).

Работы по экспрессии и выделению белка, а также уточнению пространственной структуры выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00164), кристаллизация и рентгеноструктурный эксперимент выполнены при поддержке Федерального

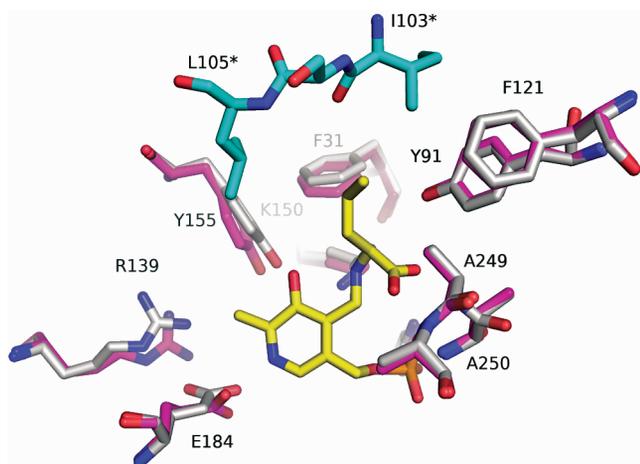


Рис. 2. Наложение остатков активного центра комплекса TUNZ1299 с L-норвалином (показана нумерация остатков) на остатки холо-формы фермента (код PDB – 5CE8).

космического агентства (проект КЭ (ЦР) “Кристаллизатор”), работы по анализу полученной структуры выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Государственного задания ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bezsudnova E.Y., Boyko K.M., Popov V.O.* // Biochemistry (Mosc). 2017. V. 82. P. 1572.
2. *Fuchs M., Farnberger J.E., Kroutil W.* // Europ. J. Org. Chem. 2015. V. 2015. P. 6965.
3. *Guo F., Berglund P.* // Green Chemistry. 2017. V. 19. P. 333.
4. *Slabu I., Galman J.L., Lloyd R.C. et al.* // Acs Catalysis. 2017. V. 7. P. 8263.
5. *Steffen-Munsberg F., Vickers C., Kohls H. et al.* // Biotechnol Adv. 2015. V. 33. P. 566.
6. *Bezsudnova E.Y., Boyko K.M., Nikolaeva A.Y. et al.* // Biochimie. 2019. V. 158. P. 130.
7. *Pavkov-Keller T., Strohmeier G.A., Diepold M. et al.* // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 38183.
8. *Zeifman Y.S., Boyko K.M., Nikolaeva A.Y. et al.* // Biochim. Biophys. Acta. Proteins Proteom. 2019. V. 1867. P. 575.
9. *Boyko K.M., Stekhanova T.N., Nikolaeva A.Y. et al.* // Extremophiles. 2016. V. 20. P. 215.
10. *Otwinowski Z., Minor W.* // Macromol. Crystallography. A. 1997. V. 276. P. 307.
11. *Kabsch W.* // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 133.
12. *Vagin A.A., Isupov M.N.* // Acta Cryst. D. 2001. V. 57. P. 1451.
13. *Vagin A.A., Steiner R.A., Lebedev A.A. et al.* // Acta Cryst. D. 2004. V. 60. P. 2184.
14. *Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G. et al.* // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 486.