

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

ПОЛУЧЕНИЕ, КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕНТГЕНОВСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КРИСТАЛЛОВ МУТАНТА КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Т С КАРМАНом ПЕРВИЧНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ И ПЕТЛЕЙ АКТИВНОГО ЦЕНТРА КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ В

© 2020 г. В. Х. Акпаров^{1,*}, Г. Е. Константинова¹, В. И. Тимофеев^{1,2,**},
И. П. Куранова^{1,2}, И. Г. Халиуллин³

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

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

³ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

*E-mail: valery@akparov.ru

**E-mail: tostars@mail.ru

Поступила в редакцию 15.05.2020 г.

После доработки 28.05.2020 г.

Принята к публикации 28.05.2020 г.

Мутантная форма карбоксипептидазы Т из *Thermoactinomyces vulgaris* КПТ11QG, содержащая замены G215S, A251G, T257A, D260G, T262D, L254I и вставку ins253T, закристаллизована в условиях микрогравитации методом встречной диффузии в капилляре. Кристаллы принадлежали пр. гр. P31, что отличается от пространственной группы кристаллов фермента дикого типа (P6322). От выращенных кристаллов на синхротроне SPring-8 собран рентгенодифракционный набор, позволяющий определить структуру при разрешении 2.45 Å.

DOI: 10.31857/S0023476120060053

ВВЕДЕНИЕ

Цинкзависимые металлокарбоксипептидазы являются важной группой экзопептидаз, участвующих во многих процессах жизнедеятельности организма в норме и патологии, в том в числе в пищеварении, процессинге нейропептидов, иммунном ответе, канцерогенезе [1–3]. Условно их можно разделить на две группы – эволюционно молодая группа карбоксипептидаз эукариотов и древняя группа карбоксипептидаз прокариотов, к которым относится и термостабильная металлокарбоксипептидаза Т (КПТ) из *Thermoactinomyces vulgaris* [4]. Карбоксипептидазы эукариотов, к которым относятся карбоксипептидазы А и В (КПА и КПВ) млекопитающих, часто представляют собой специализированные ферменты с узкой субстратной специфичностью. Например, КПА отщепляет только гидрофобные, а КПВ – только положительно заряженные остатки с С-концов пептидов и белков.

Если механизм субстратной специфичности карбоксипептидаз эукариотов изучен достаточно хорошо благодаря работам Вейли, Кристиансона,

Липскомба, Гарделла, то структурные основы субстратной специфичности микробных карбоксипептидаз изучены недостаточно. Центральную роль в селективности карбоксипептидаз эукариотов, например карбоксипептидаз А, В, О, U, играет карман первичной селективности с расположенным на его дне ключевым аминокислотным остатком, замена которого часто приводит к полному переключению селективности. Так, замена остатка аспарагиновой кислоты 255 на аргинин переключила КПВ в глутаматспецифичную карбоксипептидазу [5]. Замена остатка аргинина на дне кармана первичной специфичности карбоксипептидазы О на остатки аспарагиновой кислоты и изолейцина превратила карбоксипептидазу О в фермент, селективно отщепляющий положительно заряженные и гидрофобные остатки соответственно [6]. Это связано с жесткостью активных центров карбоксипептидаз, способных связывать только определенные структуры субстратов [7]. В результате для каждой группы субстратов в случае панкреатических карбоксипептидаз имеется свой пищеварительный фермент – карбоксипептидаза А, А2, В.

В связи с ограниченностью геномного пространства микроорганизмы имеют меньшее число пищеварительных ферментов, но зато они обладают широкой субстратной специфичностью и могут отщеплять практически любые аминокислотные остатки. Комплементарность субстрата и кармана первичной специфичности в этом случае играет меньшую роль. Так, замена остатка аспарагиновой кислоты на дне кармана первичной специфичности КПП на остаток изолейцина не превращает ее в КПА-подобный фермент [8]. Полная замена кармана первичной специфичности на карман КПВ не только не превратила КПП в КПВ-подобную карбоксипептидазу, но и не изменила преимущественно гидрофобную первичную специфичность КПП [9, 10]. Дистантные структурные детерминанты специфичности КПП, такие как ионы кальция [11], не отвечали за пониженную эффективность гидролиза положительно заряженных субстратов КПП. Таким образом, КПП представляет собой интересный объект для изучения неканонических механизмов субстратной специфичности простейших молекулярных машин, какими являются монодоменные металлокарбоксипептидазы.

В настоящей работе для изучения роли еще одного структурного элемента карбоксипептидазы, отличающего КПВ и КПП, – подвижной петли активного центра – получен мутант КПП, воспроизводящий не только сайт первичной специфичности, но и петлю активного центра. Петля активного центра состоит из десяти аминокислотных остатков и содержит в своем составе Tyr255 (Tyr248 по нумерации КПА), участвующий в индуцированном соответствии Кошланда. В КПВ этот элемент представляет собой часть α -спирали, в КПП – является частью спирали 3_{10} благодаря делеции остатка в 253 положении. Помимо инсерции вставки insThr253 и замены Leu254Ile в петлю активного центра была введена мутация Gln249Gly, устраняющая стерические препятствия со стороны боковой группы Gln249 для правильного сворачивания белковой глобулы. В результате получен мутант КПП11QG, который удалось сконцентрировать до 10 мг/мл и закристаллизовать в присутствии сульфата аммония в качестве осадителя. Этот мутант, воспроизводящий петлю активного центра КПВ, должен дать ответ о ее роли в субстратной селективности КПП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мутантный вариант гена pro-crT11QG был получен в ООО “Евроген”, Россия. Наличие мутаций подтверждено секвенированием.

Получение рекомбинантной КПП. Экспрессию гена pro-crT11QG проводили в клетках *Escherichia*

coli BL21(DE3) pLysS (Novagene) согласно инструкции производителя [12]. После индукции экспрессии с помощью изопропил- β -D-тиогаляктопиранозид (IPTG) клетки разрушали ультразвуком.

Выделение проКПП11QG из телец включения проводили согласно [13]. Для получения зрелого фермента к раствору проКПП11QG добавляли субтилизин 72 в соотношении КПП к субтилизину 200 : 1 (по весу) и инкубировали 4 ч при 37°C. Субтилизин инактивировали добавлением диизопропилфторфосфата. Раствор с активированной КПП 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 аффинным сорбентом CABS-Сефарозой [14] (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 КПП11QG 10 мМ буфером Tris/HCl, pH 9.0. Фракции, содержащие активный белок, объединяли и концентрировали до 1 мл. Затем 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. Белок концентрировали до 10 мг/мл по Брэдфорду [15] и стерильно фильтровали с помощью центрифужных патронов Centripack. Далее этот раствор использовали для кристаллизации белка. Отсутствие субтилизиновой активности было подтверждено с помощью специфического хромогенного субстрата ZAALpNA. DsNa-ПААГ-электрофорез проводили согласно Лэммли [16].

Кристаллизация КПП11QG. Кристаллы КПП11QG выращены в условиях микрогравитации с использованием метода встречной диффузии в капилляре через слой геля. Использовали оборудование и технологию, разработанные Аэрокосмическим агентством Японии [17, 18]. 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 агарозным 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, содержащем 0.5 М NaCl, 10 мМ CaCl₂, 0.1 мМ ZnSO₄. Несколько устройств в специальной упаковке доставляли на Международную космическую станцию, где

Таблица 1. Статистические характеристики набора, собранного от кристалла КПТ11QG

Обработка набора	
Пр. гр.	<i>P31</i>
$a = b, c, \text{Å}; \alpha = \beta, \gamma, \text{град}$	48.69, 117.53; 90, 120
Разрешение, Å	30.0–2.45 (2.58–2.45)*
Количество независимых рефлексов	11 422 (4201)
Полнота, %	99.56 (99.52)
$I/\sigma(I)$	4.14 (2.62)
R _{meq} -F, %	14.4 (24.0)

* В скобках приведены значения для последней оболочки.

проводили кристаллизацию при 20°C. Кристаллы для сбора дифракционных данных извлекали из капилляра в раствор осадителя и после перенесения в криораствор замораживали в парах жидкого азота. Кроме компонентов осадителя криораствор содержал 20% глицерина (по весу).

Сбор и обработка дифракционных данных. От выращенных кристаллов при температуре 100 К собран дифракционный набор до разрешения 2.45 Å на синхротоне SPring-8 (Япония, станция BL41XU). В качестве детектора использовали EIGER. Дифракционные данные получены методом вращения с одного кристалла при расстоянии между кристаллом и детектором 300 мм и длине волны 0.8 Å; углы качания и вращения 0.1° и 120° соответственно. Обработку набора экспериментальных интенсивностей проводили с помощью программы iMosflm [19]. Статистические характеристики набора приведены в табл. 1. Кристаллы относятся к пр. гр. *P31*. В независимой части ячейки содержится одна молекула фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выращенные кристаллы дифрагировали до разрешения 2.45 Å и принадлежали пр. гр. *P31* со следующими параметрами элементарной ячейки: $a = b = 48.69, c = 117.53 \text{ Å}, \alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$. Оценка содержания растворителя в элементарной ячейке по методу Мэттьюса [20], проведенная с помощью программного пакета CCP4 [21], показала, что в независимой части ячейки содержится одна субъединица белка. Полученный набор позволяет установить структуру мутантной формы КПТ11QG при разрешении 2.45 Å.

Примечательно, что кристаллы КПТ11QG принадлежат к иной пространственной группе,

нежели кристаллы дикого типа, кристаллы мутанта с имплантированным центром субстратной специфичности панкреатической карбоксипептидазы В КПТ5 (G215S, A251G, T257A, D260G, T262D), а также мутант КПТ с заменой в подвижной петле активного центра (КПТ L254N), что было показано в многочисленных экспериментах [18, 22–25]. Все эти формы принадлежат пр. гр. *P6322*. Можно предположить, что изменение пространственной группы вызвано вставкой дополнительного аминокислотного остатка (ins253Tyr) в подвижную петлю активного центра.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00220) в части выделения и очистки белка, Федеральной космической программы 2016–2025 (ОКР “МКС (Наука)”) в части выращивания кристаллов в условиях невесомости, а также при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН в части получения и обработки рентгенодифракционных наборов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Perez-Silva J.G., Espanol J., Velasco G., Quesada V. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. № D1. P. D351.
2. Turk B., Turk D., Turk V. // *EMBO J.* 2012. V. 31. № 7. P. 1630.
3. Turk B. // *Nat. Rev. Drug Discovery.* 2006. V. 5. № 9. P. 785.
4. Teplyakov A., Polakov K., Obmolova G. et al. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 208. № 2. P. 281.
5. Edge M., Forder S., Hennam J. et al. // *Protein Eng.* 1998. V. 11. № 12. P. 1229.
6. Garcia-Guerrero M.C., Garsia-Prado J., Beringuer E. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 17. P. E3932.
7. Akparov V., Timofeev V., Khaliullin I. et al. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2018. V. 36. № 4. P. 956.
8. Grishin A.M., Akparov V.K., Chestukhina G.G. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2008. V. 21. № 9. P. 545.
9. Акпаров В.Х., Гришин А.М., Юсупова М.П. и др. // *Биохимия.* 2007. Т. 72. № 4. С. 515.
10. Akparov V., Timofeev V., Kuranova I., Rakitina T. // *Acta Cryst. F.* 2018. V. 74. № 10. P. 638.
11. Гришин А.М., Акпаров В.Х., Честухина Г.Г. // *Биохимия.* 2008. Т. 73. № 10. С. 1422.
12. Novagen pET System Manual TB055 7th Ed. // Novagen Madison W.I. 1997.
13. Trachuk L., Letarov A., Kudelina I. et al. // *Protein Expr. Purif.* 2005. V. 40. № 1. P. 51.
14. Cueni L.B., Bazzone T.J., Riordan J.F. // *Anal. Biochem.* 1980. V. 107. № 2. P. 341.
15. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248.

16. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680.
17. *Takahashi S., Tsurumura T., Aritake K. et al.* // Acta Cryst. F. 2010. V. 66. № 7. P. 846.
18. *Куранова И.П., Смирнова Е.А., Абрамчик Ю.А. и др.* // Кристаллография. 2011. Т. 56. № 5. С. 944.
19. *Battye T., Kontogiannes L., Johnson O., Powel H.* // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. Pt 4. P. 271.
20. *Matthews B.W.* // J. Mol. Biol. 1968. V. 33. P. 491.
21. *Winn M.D., Ballard C.C., Kowtan K.D. et al.* // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. № 4. P. 235.
22. *Акпаров В.К., Тимофеев В.И., Константинова Г.Е. et al.* // PLOS One. 2019. V. 14. № 12. P. 1.
23. *Акпаров В.К., Тимофеев В.И., Халиуллин И.Г. et al.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2018. V. 36. № 15. P. 3958.
24. *Акпаров В.Х., Тимофеев В.И., Халиуллин И.Г. и др.* // Биохимия. 2019. Т. 84. № 1. С. 53.
25. *Акпаров В.Х., Гришин А.М., Тимофеев В.И., Куранова И.П.* // Кристаллография. 2010. Т. 55. № 5. С. 851.