

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73 + 577.1

РОЛЬ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ГЕКСАМЕРНОЙ МОЛЕКУЛЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ УРИДИНФОСФОРИЛАЗ В СВЯЗЫВАНИИ СУБСТРАТОВ

© 2021 г. К. М. Поляков^{1,*}, Н. Н. Мордкович², Т. Н. Сафонова², А. Н. Антипов²,
Н. А. Огорокова², П. В. Дороватовский³, В. П. Вейко^{2,**}

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

² Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия

³ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: kmpolyakov@gmail.com

**E-mail: vladveiko@yahoo.com

Поступила в редакцию 17.09.2020 г.

После доработки 19.11.2020 г.

Принята к публикации 19.11.2020 г.

Получены кристаллы и определены трехмерные структуры мутантных форм уридинфосфоорилазы из *Shewanella oneidensis* MR-1 по остатку треонина активного центра. Показано, что петля 161–179, ответственная за узнавание нуклеозида, участвует в стабилизации гексамерной структуры белка, а ее разупорядочение существенно облегчает проникновение молекулы нуклеозида в активный центр фермента. Обсуждается роль конформационных изменений в функционировании фермента.

DOI: 10.31857/S0023476121050192

ВВЕДЕНИЕ

Уридинфосфоорилаза (УФ, КФ 2.4.2.3) – ключевой фермент пиримидинового обмена [1–3]. УФ катализирует расщепление гликозидной связи С–N в урдине с образованием урацила и рибозо-1'-фосфата. Этот фермент участвует в катаболизме пиримидиновых нуклеозидов, играет важную роль в гомеостатической регуляции концентрации уридина в плазме, он обнаружен в большинстве тканей и опухолей практически всех живых организмов. Интерес к исследованию молекулярных основ действия УФ базируется на данных о том, что в клетках злокачественных новообразований у человека наблюдается повышенный уровень активности УФ [4]. Показано, что экспрессия УФ в некоторых опухолях в 2–4 раза выше по сравнению с соседними нормальными тканями [5]. Изучение структурно-функциональной взаимосвязи в УФ может существенно упростить дизайн высокоэффективных ингибиторов данного фермента, позволяющих подавить развитие и метастазирование опухоли.

К настоящему времени решены кристаллические структуры семи представителей УФ бактерий. Все эти ферменты формируют гексамерные молекулы с точечной симметрией 32. На основании структурных исследований для УФ было сде-

лано предположение, что связывание нуклеозида происходит в открытой конформации фермента [6]. Доступ в активный центр мономера в открытой конформации обеспечивается за счет смещения петли, предшествующей С-концевой α -спирали, и частичного разупорядочения этих участков цепи. Ранее аналогичные конформационные изменения структуры мономеров были установлены для пуриновых нуклеозидфосфоорилаз [7].

Несмотря на активное исследование УФ из разных источников, молекулярный механизм реакции, катализируемой этим белком, остается не до конца выясненным. Особый интерес представляет остаток треонина активного центра, инвариантный в структурах УФ [8], который по данным рентгеноструктурного анализа (РСА) осуществляет непосредственный контакт с обоими субстратами – уридином и ионом фосфата [6]. Для более детального изучения роли этого остатка в функционировании УФ ранее были получены две мутантные формы УФ из *Shewanella oneidensis* MR-1 (SoУФ) по остатку треонина 91 активного центра, замененного на аланин и серин (T91A и T91S соответственно), и исследованы их ферментативные характеристики [9]. В настоящей работе получены кристаллы этих мутантов и определены их пространственные структуры методом РСА. В результате исследования выявлены

конформационные изменения для мутантной формы T91A, проявляющиеся как разупорядочение функциональной петли 161–179, которая включает в себя остатки, участвующие в связывании основания нуклеозида. Такие конформационные изменения приводят к повышению доступности активного центра молекулы белка для нуклеозида даже по сравнению с открытой формой фермента. В работе обсуждается роль этих изменений в связывании субстратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение мутантных форм уридинфосфориллазы. Мутантные формы УФ из *Sh. oneidensis* MR-1 по остатку треонина активного центра (T91S и T91A) были получены ранее, их ферментативные характеристики приведены в [9]. Рекombинантные белки выделены в гомогенном состоянии по методике, описанной в [8], их первичные структуры подтверждены методом MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометрического анализа их триптических гидролизатов.

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [10] с окраской реагентом “Bio-Rad Protein Assay” (“Bio-Rad”, США). В качестве стандарта использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (“Sigma”, США). Ферментативную активность рекомбинантных УФ и их мутантных форм определяли в калий-фосфатном буфере по методике [11].

Сохранение мутантными формами SoУФ четвертичной структуры подтверждали методом аналитической гель-фильтрации на колонке Tricorn 10/300 с сорбентом Superdex 200 с использованием прибора АКТА FPLC (“GE Healthcare”, Великобритания) в 10 mM натрий-фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 150 mM NaCl. В качестве белков-маркеров использовали набор “Gel Filtration Calibration Kits” (GE Healthcare Life Sciences, Великобритания), а также рекомбинантную SoУФ из *Sh. oneidensis* MR-1.

Кристаллизацию мутантных форм SoУФ проводили методом “висячей капли” посредством диффузии в парах при комнатной температуре в термостатированной комнате с использованием стандартных наборов для кристаллизации (скрининга) глобулярных белков компании Hampton Research. Для кристаллизации использовали лиофильно высушенный препарат, растворенный в деионизированной воде (MilliQ) с концентрацией 20 мг/мл. Раствор белка центрифугировали непосредственно перед кристаллизацией на микроцентрифуге в течение 10 мин со скоростью 18000 об./мин для удаления инородных частиц и агрегатов. Для приготовления каждой капли использовалось 2.0 мкл раствора белка, который смешивался с противораствором в соотношении

1:1. Объем противораствора в резервуаре составлял 400 мкл. Кристаллизацию проводили в пластиковых планшетах для висячих капель “Linbro” фирмы Hampton Research с использованием силиконированных стекол диаметром 22 мм фирмы Hampton Research. Кристаллы мутантной формы T91S были получены с использованием буфера 0.1 M Bis-Tris (pH 6.5), содержащего 0.2 M сульфата аммония и полиэтиленгликоль (ПЭГ) 3350 (25 мас. %), в качестве противораствора. Кристаллы мутантной формы T91A получены с использованием раствора 1.0 M моногидрата сульфата лития с добавлением ПЭГ 8000 (2 мас. %). Кристаллы, пригодные для РСА, выросли в течение одной–двух недель.

Сбор и обработка дифракционных данных. Наборы дифракционных данных собраны до разрешения 1.65 и 1.90 Å для T91S и T91A соответственно на станции белковой кристаллографии “Белок” синхротрона Национального исследовательского центра “Курчатовский институт” при температуре 100 К. Перед сбором данных кристаллы помещали в крио-растворы, приготовленные из кристаллизационных растворов с добавлением 25% глицерина. Обработку дифракционных данных проводили по программам XDS и XSCALE [12].

Решение и уточнение структур мутантов. Структуры решены методом молекулярного замещения по программе MOLREP [13] с использованием в качестве стартовой модели нативной УФ из *Shewanella oneidensis* MR-1 [6], из которой предварительно были удалены молекулы воды. Кристаллографическое уточнение структуры проводили по программе REFMAC5 [14]. Исправление моделей структур с визуальным контролем параметров стереохимии проводили по программе COOT [15]. Структура T91S решена с разрешением 1.65 Å и уточнена до значения $R_{\text{work}} = 19.4\%$. Уточнение структуры мутантной формы T91S проводили с учетом двойникования. Структура T91A решена с разрешением 1.90 Å и уточнена до значения $R_{\text{work}} = 15.6\%$. Рисунки приготовлены по программе CCP4MG [16]. Кристаллографические расчеты были проведены с использованием комплекса программ CCP4 [17]. Межмолекулярные контакты в олигомерах анализировали по программе PISA [18]. В табл. 1 приведены статистические характеристики наборов рентгеноструктурных данных и уточненных структур.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кристаллы мутантных форм T91A и T91S выращены, как указано выше, в различных условиях. Для всех кристаллографически независимых мономеров обеих структур электронная плотность подтверждает замены аминокислотного

Таблица 1. Кристаллографические данные и статистические характеристики наборов рентгеноструктурных данных и уточнения структур

Структура	Мутант T91S	Мутант T91A
Станция сбора данных	Станция Белок, Курчатowski институт	Станция Белок, Курчатowski институт
Пространственная группа	$P2_1$	$P3$
$a, b, c, \text{Å}; \alpha, \beta, \gamma, \text{град}$	91.40, 95.49, 91.41; 90, 120.1, 90	91.66, 91.66, 47.56; 90, 90, 120
Разрешение, Å	1.65 (1.75–1.65)*	1.90 (2.02–1.90)
Полнота набора, %	97.4 (88.9)	99.4 (98.5)
Повторяемость	4.9	6.4
$I/\sigma(I)$	8.8 (3.08)	15.6 (3.24)
$R_{\text{meas}}, \%$	13.9 (54.9)	12.3 (68.8)
CC(1/2), %	99.3 (88.3)	99.8 (86.9)
Среднее значение В-фактора для всех атомов, Å^2	14.3	19.6
Число двойниковых доменов кристалла	6**	1
$R_{\text{work}}, \%$	19.4	15.6
$R_{\text{free}}, \%$	23.3	22.1
Число мономеров в независимой части ячейки	6	2
Число уточняемых атомов белка	10946	3590
Число уточняемых молекул воды	839	295
R.m.s.d. от идеальной геометрии, по длинам валентных связей Å	0.020	0.016
R.m.s.d. от идеальной геометрии по валентным углам, град	2.1	2.3

* В скобках приведены значения для последнего слоя.

** Заселенности доменов 0.085, 0.411, 0.137, 0.225, 0.051, 0.091.

остатка в положении 91. В активном центре структуры T91S локализованы молекула урацила в одном мономере, сульфат-ионы в четырех мономерах и молекула глицерина в двух мономерах. Кроме того, в этой структуре локализованы два сульфат-иона, расположенные на оси третьего порядка гексамерной молекулы фермента. В структуре T91A надежно идентифицированы четыре молекулы глицерина, шесть ионов сульфата и ион лития, расположенный на некристаллографической оси симметрии, связывающей независимые мономеры. Однако в этой структуре не удается найти ионы сульфата, расположенные на оси третьего порядка. Несмотря на то что в независимой части элементарной ячейки структуры мутанта T91S содержится шесть кристаллографически независимых мономеров, а в структуре мутанта T91A – два мономера, функциональными олигомерами в обеих структурах являются сходные гексамерные структуры.

Гексамер T91S сформирован шестью кристаллографически независимыми мономерами и имеет некристаллографическую симметрию 32 (рис. 1). Гексамер T91S состоит из трех димеров, связанных некристаллографической осью третьего

порядка. Мономеры в димере связаны некристаллографическими осями симметрии второго порядка. Все мономеры находятся в закрытой конформации. Петля, предшествующая концевой α -спирали (остатки 220–235), частично разупорядочена во всех мономерах. На оси некристаллографической симметрии третьего порядка с двух сторон гексамера локализованы ионы сульфата, координированные остатками аргининов 175 трех мономеров.

Гексамер T91A состоит из несимметричных димеров, связанных кристаллографической осью третьего порядка (рис. 2). Оба независимых мономера (A и D) находятся в открытой конформации. Отметим, что остатки петли 161–179 в мономере A не локализованы. Эта петля содержит глутамин 163 и аргинин 165, участвующие в связывании основания нуклеозида, а также аргинин 175, связывающий ион сульфата/фосфата на оси третьего порядка. Во втором мономере (мономере D) эта петля локализована на картах электронной плотности, но атомы соответствующих остатков имеют более высокие температурные факторы (около 40 \AA^2) по сравнению со средним температурным фактором по молекуле (19.6 \AA^2).

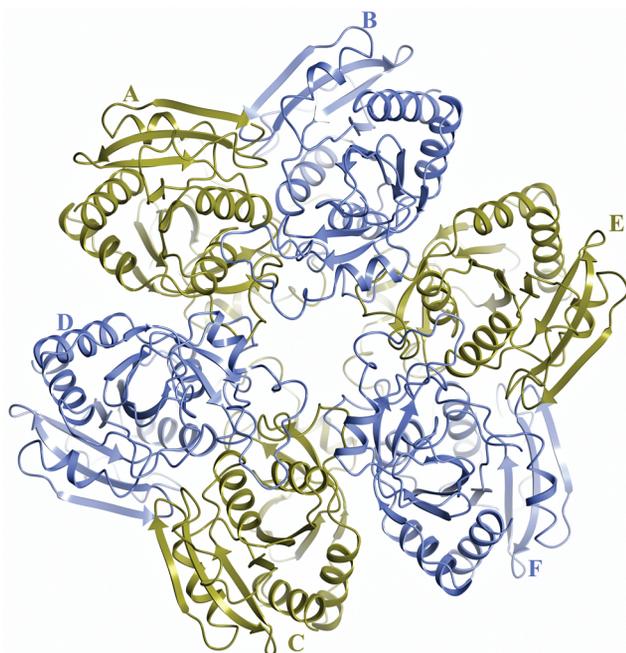


Рис. 1. Ход полипептидной цепи в гексамерной молекуле T91S. Гексамер образован шестью кристаллографически независимыми мономерами.

Такое структурное различие мономеров и приводит к несимметричности гексамерной молекулы. Подобно мономерам в структуре T91S три мономера в T91A (мономер D и его симметричные копии) образуют контакты в области оси третьего порядка (рис. 2).

По оценкам программы PISA [18] гексамеры мутантных форм УФ стабильны. Энергии диссоциации гексамеров равны 70.6 и 36.0 ккал/моль для T91S и T91A соответственно. Такая разница в энергии диссоциации объясняется вкладом связывания двух сульфат-ионов, присутствующих на оси третьего порядка в структуре T91S (около 26.0 ккал/моль), и упорядочением в этой структуре петли 161–179.

В структурах обоих мутантов остаток аргинина 175 в мономерах с упорядоченной петлей 161–179 принимает участие в стабилизации гексамеров за счет водородных связей с карбонильными атомами кислорода соседних мономеров (рис. 3). Кроме того, аргинин 175 образует солевые мостики с атомами ионов сульфата, расположенными на оси третьего порядка. Отметим, что в структуре T91A ионы сульфата на кристаллографической оси не выявлены. Сравнение структур T91A и T91S в области связывания этого сульфат-иона показано на рис. 3. Связывание одного иона сульфата на оси третьего порядка приводит к увеличению свободной энергии диссоциации гексамера на 13 ккал/моль.

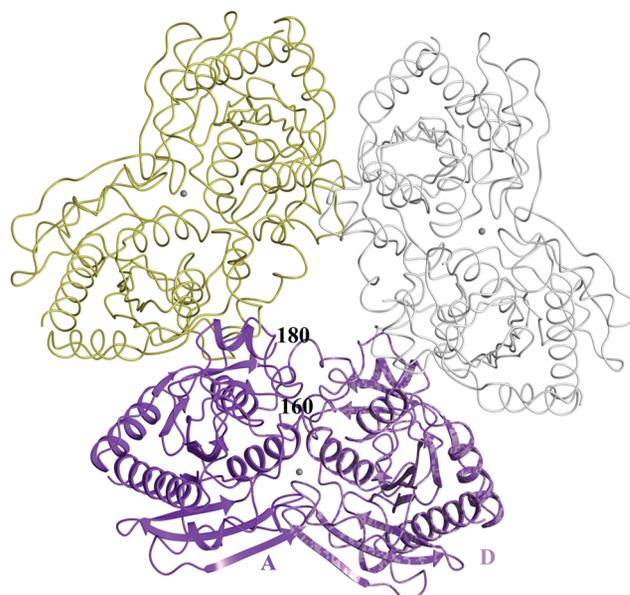


Рис. 2. Ход полипептидной цепи в гексамерной молекуле T91A. Кристаллографически независимые мономеры A и D показаны как модели с β -слоями и α -спиралями. Димеры, связанные с исходным димером кристаллографической осью третьего порядка, показаны в виде ленточной модели с разными оттенками. В мономере A обозначены номера остатков, между которыми не локализована петля (160–180).

Сравнение мономера D структуры T91S в закрытой конформации и мономера A структуры T91A в открытой конформации с разупорядоченной петлей 161–179 приведено на рис. 4. Смещение петли в районе остатка 224 от активного центра, наблюдаемое в открытой конформации, может обеспечивать доступ молекулы нуклеозида в активный центр фермента. Дополнительное разупорядочение

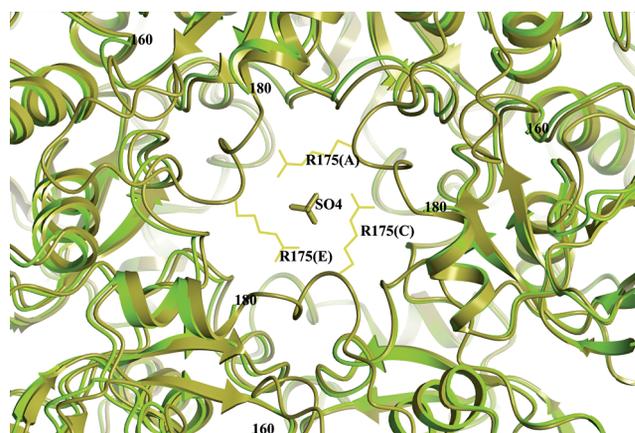


Рис. 3. Сравнение структур T91A (мономеры A, E и C; темный цвет) и T91S (мономер A; светлый цвет) для области связывания сульфат-иона на оси третьего порядка гексамера.

порядочение петли 161–179 в структуре мономера в открытой конформации значительно облегчает встраивание молекулы нуклеозида в активный центр фермента.

Анализ структур УФ из PDB, решенных с разрешением выше 2 Å, показал, что все УФ из бактерий образуют гексамеры. В большинстве структур гексамеры имеют некристаллографическую ось симметрии третьего порядка. В таких структурах гексамеры симметричны и аналогичны структуре гексамера T91A. Однако для четырех бактериальных УФ из семи исследованных были получены кристаллические модификации, содержащие в структуре гексамеры с кристаллографической осью третьего порядка. При этом кристаллографически независимые мономеры в димерах могут быть как симметричными (*E. coli*, PDB_ID 1rxu; *Yersinia pseudotuberculosis*, PDB_ID 4ny1), так и несимметричными (структуры мутантной формы T91A из *Shewanella oneidensis* и УФ из *Salmonella typhimurium* (PDB_ID oxf, 3hsw, 1y1t)). В случае формирования несимметричного димера одна из молекул димера частично разупорядочена (отсутствуют остатки в районе петли 161–179).

Считается, что субстраты способны проникать в активный центр фермента, находящегося в открытой конформации, и связываться там. Однако сравнение структур мономеров в закрытой конформации из симметричных димеров и структур мономеров несимметричных димеров с разупорядоченной петлей 161–179 (на примере структур мономеров мутантных форм T91S и T91A) показывает, что проникновение молекулы нуклеозида в активный центр существенно облегчается в случае разупорядоченной петли 161–179 в несимметричных гексамерах (рис. 4).

Можно предположить, что встраивание субстрата в активный центр УФ происходит именно в мономеры с разупорядоченной петлей в районе остатков 161–179. При этом объемная молекула нуклеозида встраивается в активный центр первой и стабилизирует петлю в районе остатков 161–179 (два остатка из этой петли, глутамин и аргинин, образуют связи с атомами основания). Связывание нуклеозида приводит к стабилизации мономера УФ в открытой конформации. Далее происходит связывание фосфат-иона в активном центре фермента, приводящее к изменению конформации мономера на закрытую. Одновременно с этим гексамерная молекула стабилизируется за счет связывания сульфат/фосфат-ионов на оси третьего порядка. Ферментативная реакция происходит в мономерах в закрытой конформации. Благодаря меньшему размеру (по сравнению с нуклеозидом) продуктов реакции выход основания нуклеотида и рибозофосфата из активного центра не требует разупорядочения петли в районе остатков 161–179.

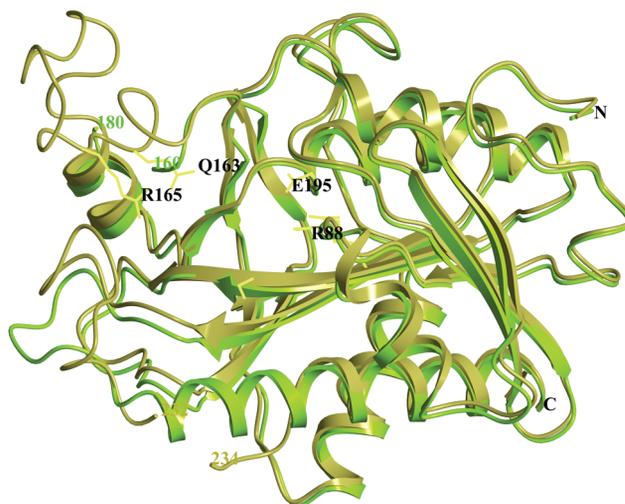


Рис. 4. Сравнение мономера А структуры T91A (темный цвет) и мономера D структуры T91S (светлый цвет). Мономер А структуры T91A находится в открытой конформации (остаток 224 смещен в сторону от остатка 165, N-концевой фрагмент последней α -спирали упорядочен). В этой структуре не локализована петля 160–180. Мономер D структуры T91S находится в закрытой конформации (остаток 224 смещен в сторону остатка 165, N-концевой фрагмент последней α -спирали упорядочен). В этой структуре не локализована петля 232–234. Для структуры T91A показаны остатки активного центра.

Присутствие ионов фосфата/сульфата на оси третьего порядка в структуре гексамера (рис. 4) может стабилизировать структуру за счет взаимодействия этих ионов с остатками аргинина 175 трех мономеров. По-видимому, ионы фосфата/сульфата принимают участие в разупорядочении петли в районе 186 остатка.

Таким образом, на основании анализа трехмерных структур мутантов T91A и T91S показано, что конформационные изменения, связанные с разупорядочением гибкой петли в районе остатков 161–179 бактериальной УФ, играют важную роль в связывании субстрата и осуществлении ферментативной реакции.

Работы в части кристаллизации мутантных форм УФ, сбора дифракционных наборов данных проведены в рамках выполнения работ по Государственному заданию Института биохимии им. А.Н. Баха, ФНИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии”, в части получения мутантных форм УФ, определения каталитической активности белка, решения, уточнения и анализа трехмерных структур мутантов – при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00784а). При проведении исследований использовали оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cao D., Pizzorno G.* // *Drugs Today (Barc)*. 2004. V. 40. P. 431.
<https://doi.org/10.1358/dot.2004.40.5.850491>
2. *Cappiello M., Mascia L., Scolozzi C. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1998. V. 1425. P. 273.
[https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(98\)00071-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(98)00071-3)
3. *Tozzi M.G., Camici M., Mascia L. et al.* // *FEBS J*. 2006. V. 273. P. 1089.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05155.x>
4. *Luccioni C., Beaumatin J., Bardot V. et al.* // *Int. J. Cancer*. 1994. V. 58. P. 517.
<https://doi.org/10.1002/ijc.2910580411>
5. *Watanabe S., Uchida T.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 216. P. 265.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2619>
6. *Safonova T.N., Mikhailov S.N., Veiko V.P. et al.* // *Acta Cryst. D*. 2014. V. 70. P. 3310.
<https://doi.org/10.1107/S1399004714024079>
7. *Koellner G., Bzowska A., Wielgus-Kutrowska B. et al.* // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 315. P. 351.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5211>
8. *Мордкович Н.Н., Манувера В.А., Вейко В.П. и др.* // *Биотехнология*. 2012. № 1. С. 21.
9. *Мордкович Н.Н., Сафонова Т.Н., Антипов А.Н. и др.* // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2018. Т. 54. № 1. С. 16.
<https://doi.org/10.7868/S0555109918010026>
10. *Bradford M.M.* // *Anal. Biochem.* 1976. V. 2. P. 248.
<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
11. *Leer J.C., Hammer-Jespersen K., Schwartz M.* // *Eur. J. Biochem.* 1977. V. 75. P. 217.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11520.x>
12. *Kabsch W.* // *Acta. Cryst. D*. 2010. V. 66. P. 125.
<https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
13. *Vagin A.A., Teplyakov A.V.* // *J. Appl. Cryst.* 1997. V. 30. P. 1022.
<https://doi.org/10.1107/S0021889897006766>
14. *Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A. et al.* // *Acta. Cryst. D*. 2011. V. 67. P. 355.
<https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>
15. *Emsley P., Lohkamp B., Scott W. et al.* // *Acta. Cryst. D*. 2010. V. 66. P. 486.
<https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
16. *McNicholas S., Potterton E., Wilson K.S. et al.* // *Acta. Cryst. D*. 2011. V. 67. P. 386.
<https://doi.org/10.1107/S0907444911007281>
17. *Winn M.D., Ballard C.C., Cowtan K.D. et al.* // *Acta. Cryst. D*. 2011. V. 67. P. 235.
<https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>
18. *Krissinel E., Henrick K.* // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 372. P. 774.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.022>