

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ РЕНТГЕНОВСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ
ФОСФОРИБОЗИЛПИРОФОСФАТСИНТЕТАЗЫ I
ИЗ *Thermus thermophilus* HB27

© 2022 г. Ю. А. Абрамчик^{1,2}, В. И. Тимофеев^{1,2,3,**}, Н. Е. Жухлистова², М. Б. Шевцов⁴,
И. В. Фатеев¹, М. А. Костромина¹, Е. А. Заяц¹, И. П. Куранова^{2,3,*}, Р. С. Есипов¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

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

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

⁴Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

*E-mail: inna@crys.ras.ru

**E-mail: tostars@mail.ru

Поступила в редакцию 22.11.2021 г.

После доработки 01.12.2021 г.

Принята к публикации 04.12.2021 г.

Кристаллы фосфорибозилпирофосфатсинтеазы из термофильной бактерии *Thermus thermophilus* (Tth PRPPS1 HB27), использованные для получения дифракционного набора, выращены методом висячей капли. Для сбора дифракционных данных кристаллы переносили в криоразтвор и замораживали в парах жидкого азота. От выращенных кристаллов на синхротроне ESRF (Франция, станция ID23-1) при температуре 100 К собран дифракционный набор до разрешения 2.6 Å, пригодный для рентгеновского исследования пространственной структуры фермента.

DOI: 10.31857/S0023476122040026

ВВЕДЕНИЕ

Фосфорибозилпирофосфатсинтеазы (PRPPS, КФ 2.7.6.1) широко распространены в прокариотических и эукариотических организмах, участвуют в ряде важных биохимических процессов, приводящих к биосинтезу пуриновых и пиримидиновых оснований [1, 2]. Эти ферменты катализируют перенос β, γ-пирофосфатной группы аденозинтрифосфата (АТФ) на гликозильный гидроксил рибоза-5-фосфата (Rib-5P), что приводит к образованию 5-фосфорибозилпирофосфата (PRPP) и аденозинмонофосфата (АМФ) [3].

Образующийся в результате реакции PRPP является промежуточным соединением при биосинтезе пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, аминокислот – гистидина и триптофана, а также кофермента NAD [2]. PRPP участвует не только в основном (*de novo*), но и в запасном путях биосинтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов и выступает регулятором обоих процессов [4–6]. Поэтому PRPP относится к метаболитам, постоянно востребованным клеткой, а PRPPS – к ключевым ферментам, необходимым для жизни организма.

PRPP-синтеазы относят к одному из трех классов в зависимости от типа четвертичной структуры, механизма регуляции активности и от специфичности к донору пирофосфатного остатка [7–9]. Между тремя классами PRPPS степень идентичности аминокислотных остатков довольно низкая. К первому классу относятся ряд бактериальных ферментов и ферменты млекопитающих, в том числе человека [10–12]. Среди ферментов первого класса сравнение аминокислотных последовательностей PRPPS показывает высокую степень гомологии [13]. Степень идентичности между ферментами из *E. coli* и *B. subtilis* достигает 49.53% (сходство 84.76%), между *E. coli* и PRPP-синтеазой человека идентичность 47.50% (сходство 80.32%). PRPPS, относящиеся к первому классу, имеют гексамерную четвертичную структуру, обладают строгой избирательностью по отношению к донору пирофосфатного остатка, а также к природе углеводного фрагмента, их активность зависит от ионов фосфата и регулируется аллостерически за счет связывания молекулы АДФ или гуанозиндифосфата (ГДФ) в аллостерическом центре. В качестве донора пирофосфата они используют только АТФ.

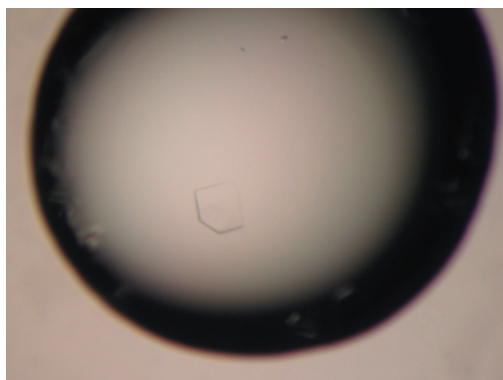


Рис. 1. Кристалл фосфорибозилпирофосфатсинтетазы *Thermus thermophilus* Tth PRPPS1.

Перспективы биотехнологического применения термофильных PRPPS вызывают интерес к изучению их пространственных структур. Ранее из термофильного штамма *Thermus thermophilus* HB27 были выделены две фосфорибозилпирофосфатсинтетазы, PRPPS1 и PRPPS2, кодируемые соответственно генами TT_C1184 и TT_C1274. Оба фермента, относящиеся к первому классу, различаются по аминокислотной последовательности и по ряду свойств [14].

Пространственная структура фосфорибозилпирофосфатсинтетазы из термофильной бактерии *Thermus thermophilus* (Tth PRPPS2 HB27) установлена с разрешением 1.85 Å (PDB_ID: 7AWO) при использовании дифракционного набора, собранного от ромбоэдрических кристаллов (пр. гр. $R32$), выращенных с применением в составе осадителя сульфата лития [15], и с разрешением 2.2 Å (PDB_ID: 5T3O) по дифракционным наборам от тетрагональных кристаллов (пр. гр. $P4_12_1$), выращенных с применением сульфата аммония в составе осадителя [16].

В настоящей работе описаны условия получения кристаллов Tth PRPPS1 HB27, от которых со-

бран дифракционный набор до разрешения 2.6 Å, пригодный для решения пространственной структуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фосфорибозилпирофосфатсинтетаза из термофильной бактерии *Thermus thermophilus* (Tth PRPPS1 HB27) получена, как описано ранее [14].

Кристаллизация. Кристаллы TthPRPPS1 HB27, использованные для получения дифракционного набора, выращены методом висючей капли (рис. 1) из раствора белка с концентрацией 12.3 мг/мл. Белковый раствор содержал 20 мМ Трис, pH 8.5, 1 мМ АТФ, 1 мМ $MgCl_2$, 5% glycerol, 0.04% NaN_3 . Состав осадителя: 5% PEG 1500, 0.45 М KCl, 0.1 М citric acid, pH 5.0, 5 мМ $MgCl_2$, 0.04% NaN_3 . Кристаллы достигали максимального размера в течение недели. Для сбора дифракционных данных кристаллы переносили в криораствор, содержащий: 20% glycerol, 5% PEG 1500, 0.45 М KCl, 0.1 М citric acid, pH 5.0, 5 мМ $MgCl_2$, 0.04% NaN_3 , и замораживали в парах жидкого азота.

Сбор и обработка дифракционных данных. Дифракционный набор до разрешения 2.6 Å собран на синхротроне ESRF (Франция, станция ID23-1) при температуре 100 К. В качестве детектора использовали Pilatus6MF. Дифракционные данные получали от одного кристалла методом вращения при расстоянии между кристаллом и детектором 400 мм и длине волны 0.96772 Å; углы качания и вращения 0.1° и 360° соответственно. Обработку набора экспериментальных интенсивностей проводили с помощью программы iMosflm [17]. Статистические характеристики дифракционных данных приведены в табл. 1. Кристаллы относятся к пр. гр. $P3_121$. В независимой части ячейки содержится шесть субъединиц гексамерной молекулы фермента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Термофильные фосфорибозилпирофосфатсинтетазы *Thermus thermophilus* HB27, Tth PRPPS1 и Tth PRPPS2, относятся к классу 1 фосфорибозилпирофосфатсинтетаз, молекулы которых имеют гомогексамерную четвертичную структуру, а их активность регулируется не только в активном, но и в аллостерическом центрах [14]. Разработаны методики выделения термофильных фосфорибозилпирофосфатсинтетаз Tth PRPPS1 и Tth PRPPS2, и исследована зависимость активности ферментов от концентрации ионов металла, неорганического фосфата и температуры [14]. Синтетазы Tth PRPPS1 и Tth PRPPS2 различаются и по первичной структуре, и по своим свойствам [14], хотя аминокислотные последовательности обоих белков имеют высокую степень

Таблица 1. Статистические характеристики дифракционного набора

Параметры обработки данных	
Пространственная группа	$P3_121$
a, c , Å	110.2, 343.1
α, γ , град	90, 120
Разрешение, Å	2.6
Количество независимых рефлексов	70267
Полнота набора, %	93.52
$I/\sigma(I)$	2.643
R _{merge} -F, %	18.8

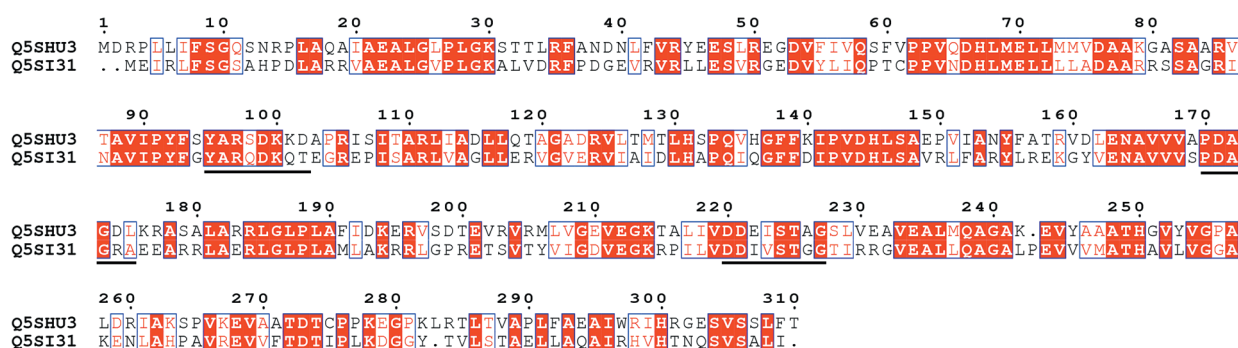


Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей ферментов Tth PRPPS2 (Q5SHU3) и Tth PRPPS1 (Q5SI31). Черными линиями подчеркнуты каталитически значимые участки молекулы.

гомологии, несколько различаясь по длине полипептидной цепи. Полипептидная цепь Tth PRPPS1 включает в себя 307, а Tth PRPPS2 – 310 аминокислотных остатков (а.о.); 152 а.о. идентичны в обеих последовательностях, степень идентичности 48.875% (рис. 2).

Ранее было идентифицировано несколько сегментов полипептидной цепи, которые необходимы для функции синтетазы PRPP. Они в основном расположены в гибких частях полипептидной цепи; это пирофосфатсвязывающая петля (петля PP₁, а. о. 170–175, здесь и далее номера соответствуют последовательности Tth PRPPS2), рибоза-5-фосфатсвязывающая петля (петля R5P, а.о. 220–227) и гибкая петля (а.о. 95–102) [18, 19]. В синтетазах PRPP, относящихся к классу 1, активный центр расположен в щели между N- и C-концевыми доменами. В N-концевом домене он ограничен а. о. гибкой петли, а в C-концевом домене – остатками из петли PP₁ и петли R5P. А. о. гибкой петли участвуют в связывании субстрата АТФ в активном сайте и ингибитора АДФ в регуляторном сайте соседней субъединицы. А. о. петли R5P взаимодействуют с ионом фосфата (сульфата в Tth PRPPS2, PDB_ID: 7AWO). Еще одна петля, каталитическая гибкая петля, содержит а. о., необходимые для каталитической активности фермента.

Сравнение аминокислотных последовательностей ферментов Tth PRPPS2 и Tth PRPPS1 после их выравнивания (рис. 2) показало, что во всех четырех сегментах полипептидной цепи, необходимых для функции синтетазы PRPP, последовательности а. о. различаются. Аминокислоты часто разделяют на группы в соответствии с гидрофобностью или гидрофильностью их боковых радикалов, их зарядностью. Если следовать такой классификации, то большинство различий в четырех сравниваемых фрагментах аминокислотных последовательностей Tth PRPPS2 и Tth PRPPS1 касается аминокислот с гидрофобным незаряженным радикалом. Например, наблюдаются за-

мены: Ile – Val, Ala – Gly, Ile – Leu, Phe – Met, Pro – Gly, Leu – Ala. Но есть и другие несоответствия. В петле R5P и каталитической гибкой петле а. о. Glu222 (петля R5P) и Asp193, Asp199 (каталитическая петля) фермента Tth PRPPS2 с отрицательно заряженными боковыми радикалами заменены в Tth PRPPS1 остатками с гидрофобными незаряженными радикалами (Glu222, Asp193, Asp199 соответственно на Ile220, Ala191, Pro197). В гибкой петле 95–104 Tth PRPPS2 Ala103 заменен на Glu101 (Tth PRPPS1) с заряженным боковым радикалом. В каталитических петлях сравниваемых ферментов можно отметить замены аминокислот с гидрофильным незаряженным радикалом на аминокислоту с заряженным радикалом. Например, Thr200 (Tth PRPPS2) на Arg198 (Tth PRPPS1) или Ser201, Thr203 (Tth PRPPS1) на Arg203, Arg205 (Tth PRPPS2).

Два а. о. из гибкой петли (Arg97 и Lys100, Tth PRPPS2), участвующие в связывании субстрата (АТФ) в активном центре, инвариантны в обеих последовательностях. Остатки Ser224, Thr225, Gly227 петли R5P, координирующие ион сульфата в Tth PRPPS2, также инвариантны. Инвариантны Asp170 (Asp168 в Tth PRPPS1) из пирофосфатсвязывающей петли и Asp220 (Asp218 в Tth PRPPS1) из рибоза-5-фосфатсвязывающей петли, участвующие в связывании иона металла. В каталитических петлях остатки лизина и аргинина (Lys194 и Arg196 в Tth PRPPS2; Lys192 и Arg194 в Tth PRPPS1), необходимые для протекания реакции [13], также сохраняются.

Как показали исследования [14], ферменты Tth PRPPS1 и Tth PRPPS2 отличаются друг от друга как по величине ферментативной активности, так и по температурной зависимости активности. Оказалось, что белки Tth PRPPS1 и Tth PRPPS2 заметно различаются по максимальной скорости реакции образования АМФ и фосфорибозилпирофосфата. При одинаковой температуре (75°C) скорость катализа Tth PRPPS2 в среднем в 26 раз выше, чем для Tth PRPPS1. Ферментативная ак-

тивность Tth PRPPS1 сильно возрастает с ростом температуры. Максимальная скорость ферментативной реакции наблюдается при 75°C. Активность белка Tth PRPPS2 также возрастает с температурой, достигая максимального значения при 85°C (в 16 раз выше, чем при 36°C), а при 92°C падает почти в 2 раза [14].

Tth PRPPS2, имеющая высокий температурный максимум, содержит большое число остатков аланина (43 остатка, 13.9%), что характерно, как показано в [20], для белков термофильных организмов. Синтетазы Tth PRPPS1 и Tth PRPPS2 различаются по числу остатков аланина в полипептидной цепи, число остатков аланина в полипептидной цепи Tth PRPPS1 несколько ниже (36 остатков, 11.7%). Для сравнения в мезофильных штаммах *E. coli* PRPPS – 33 остатка аланина (10.48%) и в *B. subtilis* – 28 (8.83%).

Известно, что PRPP-синтетазы, относящиеся к классу 1, активируются ионами магния и фосфата. Предполагается, что MgATФ является истинным субстратом фермента. Кроме того, ионы магния непосредственно связываются с ферментом в аллостерическом центре. Механизм связывания ионов магния и фосфата был изучен для PRPP-синтетазы из *E. coli* [21, 22].

Показана разная зависимость активности обоих ферментов от концентрации ионов магния. Для фермента Tth PRPPS1 активность достигает максимального значения при концентрации ионов магния 0.5 мМ; при дальнейшем повышении концентрации ионов магния активность уменьшается. Максимум активности для Tth PRPPS1 наблюдался при двукратном недостатке магния по отношению к АТФ. Для Tth PRPPS2 скорость значительно возрастает при избытке магния, достигая максимального значения при концентрации Mg²⁺, равной 5 мМ [14].

Изучение зависимости активности Tth PRPPS1 и Tth PRPPS2 от концентрации фосфата также показало значительные различия между обоими белками [14]. Для Tth PRPPS2 максимальная активность наблюдалась при концентрации фосфата 20 мМ, после чего происходило ингибирование активности фермента избытком фосфата. Максимальную активность для Tth PRPPS1 наблюдали при концентрации фосфата 100 мМ.

Таким образом, оба фермента – Tth PRPPS1 и Tth PRPPS2, принадлежащие первому классу фосфорибозилпирофосфатсинтетаз, характеризуются высоким температурным максимумом активности. Исследование пространственной струк-

туры позволит проследить особенности строения молекулы Tth PRPPS1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-13-00429) и Министерства науки и высшего образования в рамках Государственного задания ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН в организации сбора данных рентгеновской дифракции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Switzer R.L. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. P. 2854.
2. Becker M.A., Raivio K.O., Bakay B. et al. // J. Clin. Invest. 1980. V. 65. P. 109.
3. Khorana H.G., Fernandes J.F., Kornberg A. // J. Biol. Chem. 1958. V. 230. P. 941.
4. Hove-Jensen B. // J. Bacteriol. 1988. V. 170. P. 1148.
5. Hove-Jensen B. // Mol. Microbiol. 1989. V. 3. P. 1487.
6. Hove-Jensen B., Nygaard P. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 126. P. 327.
7. Krath B.N., Hove-Jensen B. // Protein Sci. 2001. V. 10. P. 2317.
8. Li S., Lu Y., Peng B., Ding J. // Biochem. J. 2007. V. 401. P. 39.
9. Kadziola A., Jepsen C.H., Johansson E. et al. // J. Mol. Biol. 2005. V. 354. P. 815.
10. Cherney M.M., Cherney L.T., Garen C.R., James M.N. // J. Mol. Biol. 2011. V. 413. P. 844.
11. Willemoes M., Hove-Jensen B., Larsen S. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 35408.
12. Hilden I., Hove-Jensen B., Harlow K.W. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 20730.
13. Hove-Jensen B., Bentsen A.K., Harlow K.W. // FEBS J. 2005. V. 272. P. 3631.
14. Есупов Р.С., Абрамчик Ю.А., Фатеев И.В. и др. // Биоорган. химия. 2016 Т. 42. № 5. С. 567.
15. Abramchik Yu., Zayats E., Kostromina M. et al. // Crystals. 2021. V. 11. P. 1128. <https://doi.org/10.3390/cryst11091128>
16. Timofeev V.I., Sinitsyna E.V., Kostromina M.A. et al. // Acta Cryst. F. 2017. V. 73. P. 369.
17. Battye T.G., Kontogiannis L., Johnson O. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. № 4. P. 271. <https://doi.org/10.1107/S0907444910048675>
18. Eriksen T.A., Kadziola A., Bentsen A.K. et al. // Nature Struct. Biol. 2000. V. 7. P. 303.
19. Smith J.L. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1995. V. 5. P. 752.
20. Hove-Jensen B., McGuire J.N. // Eur. J. Biochem. 2004. V. 271. P. 4526.
21. Cherney M.M., Cherney L.T., Garen C.R., James M.N. // J. Mol. Biol. 2011. V. 413. P. 844.
22. Willemoes M., Hove-Jensen B. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 5078.