

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 538.911

СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Т ИЗ *THERMOACTINOMYCES VULGARIS* С *L*-ФЕНИЛЛАКТАТОМ

© 2024 г. В. Х. Акпаров^{1,*}, Г. Е. Константинова¹, В. И. Тимофеев¹, М. Б. Швецов²,
И. П. Куранова^{1,2}

¹Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова Курчатовского комплекса кристаллографии и фотоники
НИИ “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

*E-mail: valery.akparov@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.12.2023 г.

После доработки 27.02.2024 г.

Принята к публикации 11.03.2024 г.

С разрешением 1.73 Å определена кристаллическая структура комплекса металлокарбоксипептидазы Т (КПТ) с *L*-фениллактидом. В отличие от панкреатической карбоксипептидазы А, связывающей одну молекулу *L*-фениллактида, в комплексе с КПТ лиганд занимает одновременно как S1, так и S1'-сайты активного центра. При этом происходят конформационные изменения, отличающиеся от изменений, вызванных поочередным занятием S1 и S1'-сайтов трет-бутил-оксикарбонил-*L*-лейцином (ВОС-лейцином) и бензилянтарной кислотой. Эти изменения касаются остатков E277, E59, L254, G192, S127 и Y218 и достигают размаха 0.77 Å. Сделан вывод о возможной роли E59 в распознавании и катализе субстратов карбоксипептидазой Т.

DOI: 10.31857/S0023476124030067, EDN: XOPTJS

ВВЕДЕНИЕ

Получение промышленно важных ферментов методом рационального конструирования не обрело широкого развития из-за сложности белков и вызванного этим недостаточного понимания связи структуры и функции ферментов, в первую очередь влияния мутаций на динамику и укладку белков, что проявляется в недостаточном учете роли малых конформационных изменений структуры ферментов при связывании и катализе субстрата [1]. Одной из удобных моделей для изучения роли конформационных сдвигов в катализе и распознавании субстрата являются металлокарбоксипептидазы. Карбоксипептидаза Т из *Thermoactinomyces vulgaris* (КПТ, КФ 3.4.17.18) является ортологом панкреатической карбоксипептидазы А, относится к монодоменным металлокарбоксипептидазам термофильных микроорганизмов и содержит ион цинка в составе каталитического центра. КПТ имеет ~30% гомологии первичной структуры с такими классическими объектами энзимологии, как панкреатические карбоксипептидазы А и В [2]. Она обладает широкой субстратной специфичностью и отщепляет с С-конца пептидов преимущественно гидрофобные (подобно карбоксипептидазе А (КПА)) аминокислотные остатки (а.о.), но способна с меньшей

активностью отщеплять и положительно (подобно карбоксипептидазе В (КПВ)), и отрицательно заряженные а.о. [3]. В распознавании С-концевого а.о. металлокарбоксипептидазами участвует так называемый карман первичной специфичности, или S1'-сайт по номенклатуре Шехтера и Бергера [4]. Согласно этой номенклатуре сайты связывания а.о. P1', P2', P3', расположенные в порядке удаления от расщепляемой связи в направлении С-конца, обозначаются как S1', S2' и т.д., а сайты, расположенные от превращаемой связи в направлении N-конца пептидного субстрата, обозначаются S1, S2, S3 и т.д. Основную роль в распознавании пептидного субстрата карбоксипептидазами играют сайты S1 и S1', расположенные вблизи каталитического центра. Сайт S1' распознает отщепляемый а.о. субстрата, при этом в структуре сайта важнейшую роль играет а.о., расположенный на его дне, который, как правило, комплементарен отщепляемому. В КПА это I255, в КПВ – D255, в КПО – R255 [5], благодаря чему эти ферменты отщепляют только гидрофобные, положительно и отрицательно заряженные а.о. соответственно. Сайт S1 распознает предшествующий расщепляемой связи P1-остаток пептидного субстрата. Например, в КПВ в положении P1 для лучшего катализа должен находиться гидрофобный а.о. При его отсутствии, в частности, в N-ацетил-аргине

отщепление аргинина с С-конца замедляется в тысячи раз по сравнению с фенилаланил-аргинином [6]. Такого рода регуляция активности каталитического центра со стороны S1'- и S1-сайтов сродни аллостерической регуляции и может сопровождаться конформационными изменениями и в активном центре, и по всей структуре фермента. Некоторые из таких изменений были выявлены ранее для КПТ. Например, разные боковые группы в P1'-положении ингибиторов — стабильных аналогов переходного состояния — вызывают разные конформационные изменения каталитических E277 и Y255 [7]. А.о. в основном состоянии в комплексах КПТ с бензилянтарной кислотой (PDB ID: 4DUK) [8] и ВОС-лейцином (трет-бутил-оксикарбонил-*L*-лейцин) (PDB ID: 4F8Z) [9], занимающими соответственно P1'- и P1-положения, также вызывают конформационные изменения в КПТ. В связи с этим интерес представляет сравнение конформационных переходов в КПТ, вызванных занятием S1- и S1'-сайтов активного центра КПТ порознь и одновременно. Такую возможность предоставляет комплекс КПТ с *L*-фениллактатом, в котором с белком связаны одновременно две молекулы ингибитора, имитирующего основное состояние двух молекул продукта, которые занимают одновременно S1- и S1'-сайты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспрессия, выделение и очистка белка. Ген, кодирующий про-КПТ (последовательность гена pro-crT *Thermoactinomyces vulgaris* депонирована в банке генов EBI/EMBL), клонировали в вектор pET23a [10]. После трансформации клетки *Escherichia coli* штамма BL21(DE3) pLysS (Novagen, EMB Bioscience Inc., San Diego, CA, USA) были пересеяны в пробирки с 5 мл среды LB с 120 мг/л ампициллина и 34 мг/л хлорамфеникола (антибиотики из ОАО “Синтез”, Россия) и инкубированы в течение 18 ч при 301 К. Затем клетки перенесли в колбы, содержащие эту же среду с добавлением 1 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ), и далее инкубировали 6 ч при 310 К. Клетки разрушали ультразвуком. Тельца включения отделяли от лизата клеток центрифугированием (20000 об./мин, 20 мин), промывали 0.05% CHAPS (*o/o*) (Sigma-Aldrich, США), 2 М NaCl (Химмед, Россия), водой, растворяли в 8 М мочеvine (Диаэм, Россия), содержащей 1 мМ дитиотрейтола (Sigma-Aldrich, США) до конечной концентрации белка по Бредфорду 5 г/л. После этого 100 мл полученного белкового раствора добавляли по каплям при интенсивном перемешивании к 1 л 50 мМ буфера Трис/HCl (Диаэм, Россия) (pH 8.0), содержащего 30% глицерина (Химмед, Россия) (*o/o*), 0.5 М NaCl, 10 мМ CaCl₂ (Sigma-Aldrich, США), 1 мМ ZnSO₄ (Sigma-Aldrich, США) 3 мМ цистина

и 10 мМ цистина (Sigma-Aldrich, США). Раствор инкубировали 16 ч при 310 К. После инкубации раствор разбавляли вдвое буфером, содержащим 50 мМ буфера Трис/HCl (pH 8.0), 0.5 М NaCl, 1 мМ ZnSO₄ и 10 мМ CaCl₂, и концентрировали до объема 20 мл ультрафильтрацией на установке Vivaflow 10 (Сартorius, США). Про-КПТ активировали инкубацией с субтилизином 72 (молярное соотношение КПТ/субтилизин 1:200) в течение 4 ч. Реакцию останавливали диизопропилфторфосфатом (Merck, Германия). Раствор белка концентрировали до 0.5 мл на патронах Microcon XM-10 (Millipore, США) и pH доводили до 6.0 с помощью 100 мМ буфера MES/NaOH (Sigma, США) (pH 5.8). Раствор белка очищали на 20 мл колонке CABS Сефарозы [10], уравновешенной 10 мМ буфером MES/NaOH, pH 6.5, содержащим 0.5 М NaCl, 10 мМ CaCl₂ и 0.1 мМ ZnSO₄. КПТ элюировали этим же буфером при pH 8.0 и КПТ-содержащие фракции объединяли. Буферный раствор заменяли раствором для кристаллизации (0.01 М буфером MES/NaOH, pH 6.5, содержащим 1 мМ CaCl₂, 0.1 мМ ZnSO₄ и 0.25 М NaCl). Окончательно белок был сконцентрирован до 10 г/л ультрафильтрацией на Amicon-Ultra 0.5 3K (Millipore, США) и стерильно профильтрован через 0.2 мкм Ultrafree-CLLG центрифужный фильтр (Merck). *L*-Фениллактат был получен от фирмы Sigma-Aldrich, США.

Кристаллизацию проводили в 24-луночных планшетах методом диффузии в парах в висячей капле в течение 5 дней при комнатной температуре и составе резервуарного раствора 1.2 М сульфата аммония, 5% 2-метил-2,4-пентадиола (MPD, Тегас, Берлин), 0.1 мМ ацетата цинка и 1 мМ хлорида кальция в 0.05 М MES/NaOH-буфере при pH 6.5. Осадитель содержал 100 мМ *L*-фениллактата в резервуарном растворе, концентрация белка составляла 10 мг/мл, соотношение растворов белка и осадителя 1 мкл/1 мкл. Криораствор представлял собой 25%-ный глицерин в осадителе.

Сбор и обработка дифракционных данных. Дифракционные данные от кристалла были собраны методом вращения при расстоянии между кристаллом и детектором 300 мм; углы качания и вращения — 0.1° и 120° соответственно. Сбор данных проводили на синхротроне ESRF (Франция) на линии ID23-1. В качестве детектора использовали Eiger 2 16M CdTe (Dectris). Обработку набора экспериментальных интенсивностей проводили с помощью программы iMosflm [11].

Разрешение и уточнение структуры. Структура комплекса КПТ–фениллактат была определена с разрешением 1.73 Å с помощью метода молекулярного замещения и программы Phaser [12] с атомными координатами КПТ (PDB ID: 3QNV) в качестве стартовой модели. Для уточнения структуры использовали программу REFMAC [13]. Ручную коррекцию модели проводили с помощью

Таблица 1. Статистические характеристики набора и уточнения структуры

Обработка набора	
Пр. гр.	<i>P</i> _{6,22}
<i>a</i> = <i>b</i> , <i>c</i> , Å	157.3, 104.1
α = β , γ , град	90, 120
Разрешение, Å	30.0–1.73 (1.82–1.73)*
Количество независимых рефлексов	11382
Полнота, %	99.98
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	12.2 (2.9)
<i>R</i> _{mrgd-F}	0.133 (0.43)
Уточнение	
PDB ID	7Q87
Разрешение, Å	30.0–1.73
Количество рефлексов	75180
<i>R</i> _{work}	0.13
<i>R</i> _{free}	0.14
Среднеквадратичные отклонения	
По длинам связей, Å	0.019
По углам, град	2.045
Карта Рамачандрана	
Наиболее благоприятные области, %	94.1
Допустимые области, %	5.5
Запрещенные области, %	0.4

программы Coot [14]. Карты электронной плотности вычислены с коэффициентами 2|F_o| – |F_c| и |F_o| – |F_c|. Молекулы воды и ионы кальция были определены по карте электронной плотности, а разностный синтез Фурье выявил электронную плотность в активном сайте, который был идентифицирован как лиганд (*L*-фениллактат). Лиганд уточнен с заселенностью 100%. Координаты структуры депонированы в Банк данных белков (PDB) (PDB ID: 7Q87). Статистические характеристики набора и уточнения приведены в табл. 1.

РУЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение структур комплексов КПТ–*L*-фениллактат (PDB ID: 7Q87) с комплексами КПТ–ВОС–*L*-лейцин (PDB ID: 4F8Z) [9], КПТ без лиганда (PDB ID: 1OBR) [15], КПТ–сульфамойл–*L*-фенилаланин (PDB ID: 4IAV) [16], КПТ–бензилянтарная кислота (PDB ID: 4DUK) [9] проводили совмещением структур по атомам следующих а.о., окружающих связанные лиганды: 166, 167, 206, 255, 287 (нумерация по КПТ). Среднеквадратичные отклонения Cα-атомов совмещенных а.о.

в парах КПТ–*L*-фениллактат:КПТ–бензилянтарная кислота, КПТ–*L*-фениллактат:КПТ–ВОС–*L*-Leu равны соответственно 0.428 и 0.348 Å.

В комплексообразование с одной молекулой КПТ вступают две молекулы *L*-фениллактата (рис. 1). Одна из них связывается в S1'-сайте, причем бензольное кольцо располагается подобно таковому в молекуле бензилянтарной кислоты в комплексе с КПТ (PDB ID: 4DUK) [17] (рис. 2), а карбоксильная и гидроксильная группы молочной кислоты располагаются подобно этим же группам молочной кислоты в комплексе *L*-фениллактата с КПА [18], не образуя связи с ионом цинка. При этом бензольное кольцо в КПА располагается в плоскости, перпендикулярной плоскости бензольного кольца в комплексах бензилянтарной кислоты и *L*-фениллактата с КПТ. Как отмечалось в [8], причина этого в укороченном расстоянии между парами остатков 260–255 и 211–257, которые ограничивают фенильное кольцо *L*-фениллактата в КПТ. Размер S1'-сайта в КПТ уменьшен по сравнению с таковым КПА благодаря заменам G253 → D260, A250 → T257 и I252 → T262 (нумерация КПА–КПТ).

В S1'-субсайте КПТ фенильное кольцо *L*-фениллактата образует гидрофобные контакты с L211, G215, A251, L254, Y255, полярные контакты с N146, S252 и E277, амфифильные контакты с T257, D260, T262 и T275. Фенильное кольцо бензилянтарной кислоты образует эти же контакты с КПТ, за исключением E277, L254 и T275 (рис. 2).

Вторая молекула *L*-фениллактата занимает сайт S1, причем карбоксильная группа *L*-фениллактата образует ионную связь с ионом цинка (рис. 3). Одна молекула воды располагается рядом с фенильным кольцом *L*-фениллактата. Заметим, что в случае лигандов-аналогов переходного состояния сульфамойл–*L*-лейцина и сульфамойл–*L*-аргинина с ионом цинка образует связь лиганд, занимающий S1'-субсайт [19].

Этот же S1-сайт занимает молекула ВОС-лейцина в комплексе с КПТ (PDB ID: 4F8Z) [9], причем боковая группа лейцина располагается на месте бензольного кольца *L*-фениллактата. Окружение бензольного кольца этой молекулы, равное 5 Å, составляют Y206, S207, L254, Y255. В окружение боковой группы ВОС-лейцина не входят L254 и Y255 (рис. 3).

При связывании двух молекул *L*-фениллактата по сравнению с молекулой бензилянтарной кислоты (лиганд S1'-сайта) в активном центре происходит сдвиг боковых групп Y255 OH на 0.68 Å, CD2 L254 на 0.43 Å, OE2 E277 на 0.48 Å (Cα на 0.11 Å). Кроме того, вне активного центра происходит сдвиг OE2 E59 на 0.64 Å, а также G192, входящего в состав γ-поворота, и S127, входящего в состав поверхностной петли.

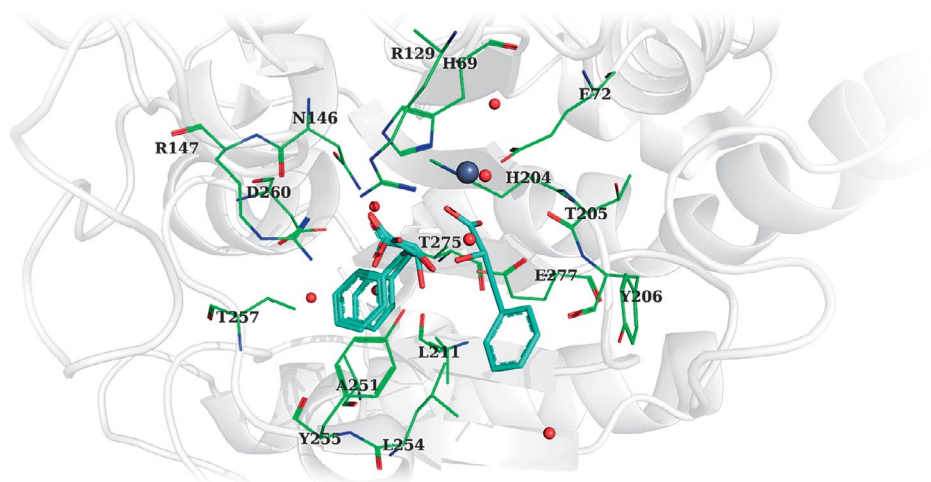


Рис. 1. Молекулы *L*-фениллактата (показаны темными стержнями) в активном центре КПТ. Аминокислотные остатки в 5 Å окружении *L*-фениллактата показаны светлыми проволочными моделями. Атом цинка изображен большой серой сферой, фиксированная вода — малыми сферами.

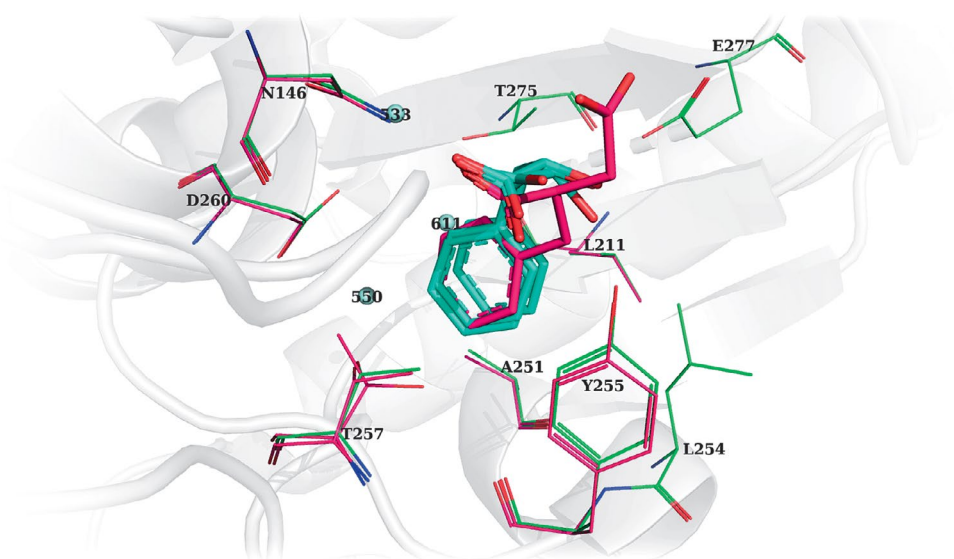


Рис. 2. Окружение молекулы фениллактата (светлые стержни) в S1'-субсайте КПТ, наложенной на молекулу бензилянтарной кислоты (темные стержни). Остатки, окружающие (4 Å) *L*-фениллактат, обозначены светлыми проволочными моделями, остатки вокруг (4 Å) бензилянтарной кислоты — темными. Вода показана малыми темными сферами.

Связывание двух молекул *L*-фениллактата по сравнению с ВОС-лейцином (лиганд S1-сайта) вызывает сдвиг (указаны максимальные значения) OE2 карбоксила боковой группы E277 на 0.28 Å, CD2 L254 на 0.49 Å. Вне активного центра на 0.77 Å смещается OE2 E59 и на меньшее расстояние (0.593 Å) — а.о. Y218, входящий в состав поверхностной петли.

Отметим, что E59 находится в составе сайта связывания иона кальция, удаление которого

влияет на селективность КПТ через взаимодействие с A251 [20].

Смещение среднеквадратичного отклонения C α -атомов по всей длине первичной структуры КПТ в комплексе с *L*-фениллактатом по сравнению с комплексами КПТ с ВОС-лейцином и бензилянтарной кислотой показано на рис. 4. Оно касается остатков G57, Y214, T247 в первом случае и остатков G55, I120, A181, M240 и T275 во втором. Таким образом, занятие одновременно S1- и S1'-сайтов

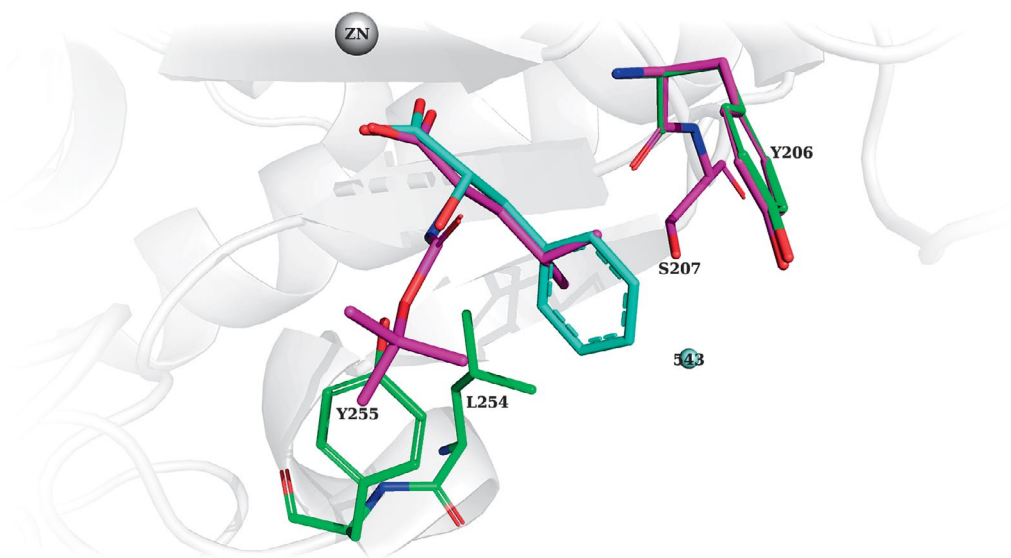


Рис. 3. 4 Å окружение молекулы *L*-фениллактата, наложенной на ВОС-лейцин, в S1-субсайте КПТ. ВОС-лейцин выделен темным, *L*-фениллактат – светлым цветом. Окружение фенильного кольца *L*-фениллактата – Y255, L254, Y206, а 4 Å окружение боковой группы ВОС-лейцина – S207, Y206. Молекулы воды показаны малой сферой, ион цинка – большой.

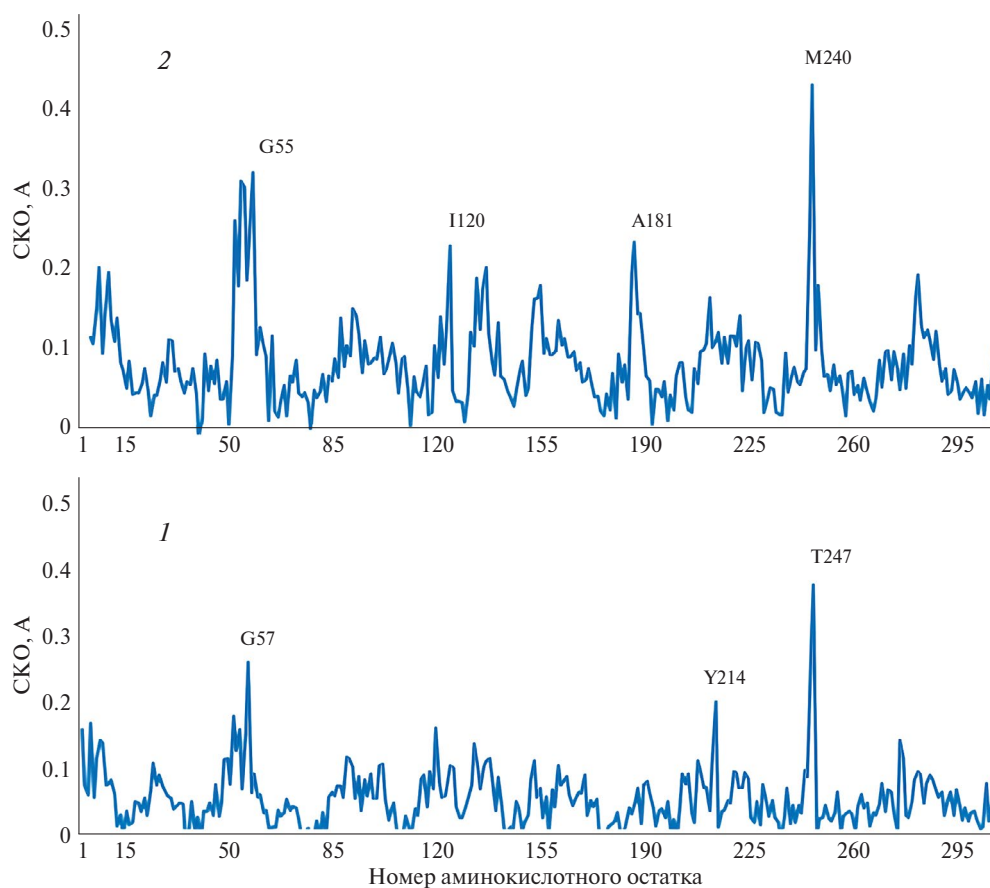


Рис. 4. Расположение конформационных сдвигов α -атомов по первичной структуре КПТ в результате комплекссообразования с *L*-фениллактатом по сравнению с комплексами КПТ с ВОС-лейцином (1) и бензилянтарной кислотой (2).

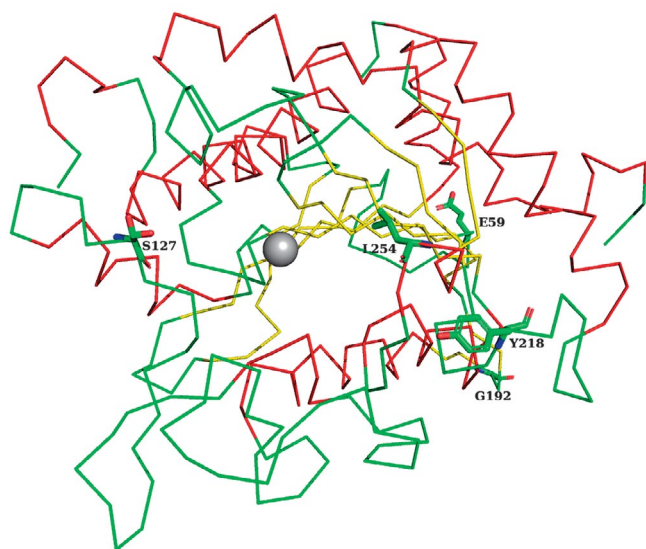


Рис. 5. Расположение конформационных перестроек в КПТ при связывании лигандов S1- и S1'-сайтов. Пронумерованы а.о. с максимальным ($>0.2 \text{ \AA}$) смещением боковых групп при связывании *L*-фенил-лактата по сравнению с бензилянтарной кислотой и ВОС-лейцином. Остальные а.о. окрашены по типу вторичной структуры.

вызывает изменения конформации КПТ, которые не наблюдаются при их поочередном занятии. Участвующие в этих смещениях остатки металлокарбоксипептидазы Т часто не совпадают с остатками активного центра и образуют сеть конформационных перестроек, возможно, имеющих значение для активности и селективности КПТ.

Подвижность G192, S127 и Y218 связана, вероятно, с тем, что они находятся на поверхности белка. Изменение в положении E277, L254 при связывании лиганда с КПТ хорошо известно [7]. Изменение в положении E59 может означать, что он является новой структурной детерминантой селективности КПТ [3] (рис. 5).

Работа выполнена в рамках государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Boehr D.D., Nussinov R., Wright P.E. // Nat. Chem. Biol. 2009. V. 5 (11). P. 789. <http://doi.org/10.1038/nchembio.232>
- Smulevitch S.V., Osterman A.L., Galperina O.V. et al. // FEBS Lett. 1991. V. 291 (1). P. 75. [http://doi.org/10.1016/001-5793\(91\)81107-j](http://doi.org/10.1016/001-5793(91)81107-j)
- Grishin A.M., Akparov V.K., Chestukhina G.G. // Biochemistry (Mosc). 2008. V. 73 (10). P. 1140. <http://doi.org/10.1134/s0006297908100118>
- Schechter I., Berger A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012. V. 425 (3). P. 497. [http://doi.org/10.1016/s0006-291x\(67\)80055-x](http://doi.org/10.1016/s0006-291x(67)80055-x)
- Bown D.P., Gatehouse J.A. // Eur. J. Biochem. 2004. V. 271 (10). P. 2000. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04113.x>
- Sukenaga Y., Akanuma H., Suekane C. et al. // J. Biochem. 1980. V. 87 (3). P. 695.
- Akparov V.K., Timofeev V.I., Konstantinova G.E. et al. // PLoS One. 2019. V. 14 (12). P. 1. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0226636>
- Akparov V.K., Timofeev V.I., Khaliullin I.G. et al. // FEBS J. 2015. V. 282 (7). P. 1214. <http://doi.org/10.1111/febs.13210>
- Timofeev V.I., Kuznetsov S.A., Akparov V.K. // Biochem. Biokhimiia. 2013. V. 78 (3). P. 252. <http://doi.org/10.1134/S0006297913030061>
- Novagen pET System Manual TB055 7th Ed. Novagen Madison WI. 1997.
- Battye T., Kontogiannis L., Johnson O. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. P. 271. <http://doi.org/10.1107/S0907444910048675>
- McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D. et al. // J. Appl. Cryst. 2007. V. 40 (4). P. 658. <http://doi.org/10.1107/S0021889807021206>
- Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67 (4). P. 355. <http://doi.org/10.1107/S90744911001314>
- Emsley P., Lohkamp B., Scott W. et al. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 486. <http://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
- Teplyakov A., Polyakov K., Obmolova G. et al. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 208 (2). P. 281. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17184.x>
- Akparov V.K., Timofeev V.I., Khaliullin I.G. // Biochemistry (Mosc). 2019. V. 83 (12–13). P. 1594. <http://doi.org/10.1134/s0006297918120167>
- Akparov V.K., Timofeev V.I., Maghsoudi N.N. et al. // Crystallography Reports. 2017. V. 62 (2). P. 249. <http://doi.org/10.1134/S106377451702002X>
- Teplyakov A., Wilson K.S., Orioli P. et al. // Acta Cryst. D. 1993. V. 49. P. 534. <http://doi.org/10.1107/S0907444993007267>
- Akparov V., Timofeev V., Khaliullin I. et al. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2018. V. 36 (4). P. 956. <http://doi.org/10.1080/07391102.2017.1304242>
- Akparov V.K., Timofeev V.I., Kuranova I.P. // Crystallography Reports. 2011. V. 56 (4). P. 596. <http://doi.org/10.1134/S106377451104002X>

STRUCTURE OF THE CARBOXYPEPTIDASE T FROM *THERMOACTINOMYCES VULGARIS* COMPLEX WITH *L*-PHENYL LACTATE

© 2024 V. Kh. Akparov^{a,*}, G. E. Konstantinova^a,
V. I. Timofeev^a, M. B. Shvetsov^b, I. P. Kuranova^{a,b}

^a*Shubnikov Institute of Crystallography of Kurchatov Complex of Crystallography and Photonics of NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia*

^b*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia*

*e-mail: valery.akparov@yandex.ru

The crystal structure of the metallocarboxypeptidase T from *Thermoactinomyces vulgaris* complex with *L*-phenylactate was obtained with a resolution of 1.73 Å. Unlike pancreatic carboxypeptidase A, which binds one *L*-phenylactate molecule, in complex with CPT, the ligand occupies both S1 and S1' sites of the active center simultaneously. In this case, conformational changes occur that differ from the changes caused by the alternate occupation of the S1 and S1' sites by BOC-leucine and benzylsuccinic acid. These changes concern the residues E277, E59, L254, G192, S127 and Y218 and reach a span of 0.77 Å. A conclusion is made about the possible role of these residues in the recognition and catalysis of substrates by carboxypeptidase T.