

На правах рукописи



Анашкин Виктор Андреевич

**БАКТЕРИАЛЬНАЯ ПИРОФОСФАТАЗА, СОДЕРЖАЩАЯ НУКЛЕОТИД-
СВЯЗЫВАЮЩИЕ CBS-ДОМЕНЫ: КИНЕТИКА И ТЕРМОДИНАМИКА КАТАЛИЗА И
РЕГУЛЯЦИИ**

02.00.10 – биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2016

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений Химического факультета и в отделе химии белка Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова».

Научный руководитель:

Байков Александр Андреевич
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Демидкина Татьяна Викторовна
доктор химических наук, профессор,
заведующая лабораторией химических основ биокатализа
ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН

Брага Элеонора Александровна
доктор биологических наук, профессор,
заведующая лабораторией патогеномики и транскриптомики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Ведущая организация:

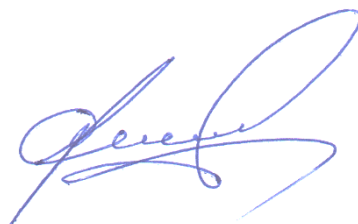
Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Защита состоится «28» февраля 2017 года в 17 часов на заседании Диссертационного совета Д 501.001.41 по химическим наукам при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 40, Институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ, аудитория 501.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке МГУ имени М. В. Ломоносова и на сайте Химического факультета МГУ (www.chem.msu.ru) в разделе «Защита диссертаций».

Автореферат разослан « » _____ 20 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук,
доцент



Смирнова И. Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Неорганический пирофосфат является метаболитом многих биосинтетических процессов. Неорганические пирофосфатазы (PPазы), присутствующие во всех клетках, гидролизуют его, тем самым сдвигая равновесия реакций в сторону биосинтеза. Уровень пирофосфата в клетках выше равновесного на 2-3 порядка, хотя растворимая пирофосфатаза постоянно присутствует в клетке и проявляет высокую активность *in vitro*. Отсюда следует, что пирофосфатаза не проявляет в клетке всю свою потенциальную активность, т.е. она регулируется. Важность регуляции активности пирофосфатазы следует и из того, что пирофосфат является регулятором важнейших биосинтетических реакций. В некоторых организмах присутствует также мембранная пирофосфатаза, действующая как H^+ - или Na^+ -помпа. Ее функционирование также зависит от уровня пирофосфата.

Существует три негомологичных семейства растворимых PPаз (*Kajander et al., 2013*). Семейство I распространено во всех организмах, семейства II и III встречаются только в бактериях и археях. Растворимые пирофосфатазы семейства I были открыты в середине 1950-х годов и довольно хорошо изучены. Они являются гомоолигомерными однодоменными белками, и для катализа им необходимы ионы магния. Каждая из двух одинаковых субъединиц растворимой пирофосфатазы семейства II образована двумя доменами (рис. 1А), причем активный центр расположен на границе доменов. Для катализа им необходимы ионы магния и переходных металлов (Mn^{2+} , Co^{2+}). Примерно четверть пирофосфатаз семейства II имеет в своем составе пару CBS-доменов (рис. 1Б), способных связывать фосфатные производные аденозина (AMP, ADP и ATP), причем AMP и ADP ингибируют, а ATP активирует фермент.

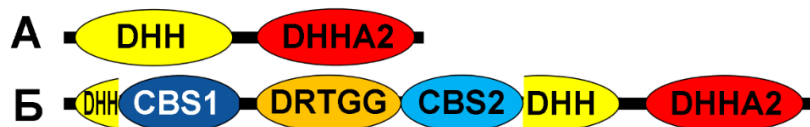


Рис. 1. Топология доменов канонической PPазы семейства II (А) и типичной CBS-PPазы (Б).

Степень разработанности темы. Пути регуляции большинства растворимых PPаз пока не известны. Наибольший прогресс достигнут для растворимых пирофосфатаз семейства II, содержащих нуклеотид-связывающие CBS-домены (CBS-PPаз), но и для них мало что известно кроме самого факта их регуляции аденозинолигофосфатами. Кинетический и молекулярный механизмы регуляции CBS-PPаз неизвестны.

Цель работы заключалась в установлении механизма регуляции CBS-PPазы. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**: 1) определить

кинетический механизм влияния лигандов активного центра (субстрата, ионов металлов) и регуляторного центра (производных аденозина) на работу фермента; 2) определить структурные элементы белка, участвующие в передаче сигнала между регуляторными и каталитическими центрами.

Научная новизна работы. Установлено, что регуляция CBS-PPазы происходит по кооперативному механизму, который имеет два аспекта: кооперативное связывание субстрата и кооперативное связывание аденозинолигофосфатов. В обоих случаях кооперативность положительная, что усиливает зависимость активности фермента от концентраций пирофосфата и аденозинолигофосфатов. Кроме этого, был выявлен еще один класс активаторов CBS-PPаз – диаденозинполифосфаты (Ar_nA , $n = 3-6$). Помимо активации фермента в несколько раз, они устраняют оба типа кооперативности в регуляции, а по своему сродству к CBS-PPазе превосходят моонуклеотиды на 2-3 порядка. Точечным мутагенезом показана важная роль остатка аспарагина в каталитической части фермента для передачи информации между субъединицами димера CBS-PPазы. Все эти результаты являются новыми.

Теоретическая значимость работы заключается в понимании регуляции работы CBS-PPазы, как наиболее простого CBS-белка, а также в возможности переноса полученных результатов на другие CBS-белки.

Практическая значимость работы. Полученные данные могут быть использованы в белковой инженерии для рационального дизайна нуклеотид-регулируемых белков.

Апробация работы. Основные результаты работы были доложены на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015», Москва, Россия (2015).

Степень достоверности представленных результатов диссертационного исследования подтверждена публикацией научных результатов в трёх научных статьях в рецензируемых научных журналах, определенных Высшей аттестационной комиссией и индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в получении исходных данных и научных экспериментах, в обработке и интерпретации экспериментальных данных, полученных лично автором, в подготовке публикаций в рецензируемых журналах по теме выполненной работы.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения с основными выводами, приложения и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 120 страницах и содержит 52 рисунка, 17 таблиц, 4 схемы, 9 уравнений, 3 приложения общим объемом 5 страниц и 96 библиографических ссылок.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Во введении (глава 1) обоснована актуальность темы работы и выбор объектов исследования, сформулированы цели и задачи работы, отмечена ее научная новизна.

Глава 2 посвящена обзору литературы по основным направлениям диссертационной работы. Приведено описание известных к настоящему моменту CBS-белков с определенной структурой. Изложена информация об основных сайтах связывания лигандов в CBS-доменах. Продемонстрирован факт малой изученности механизма влияния CBS-доменов в различных CBS-белках.

В главе 3 (Экспериментальная часть) описаны использованные в работе практические методы, а также приведены методики построения теоретической модели РРаза семейства II и моделирования для нее молекулярной динамики. Детально описаны методики получения необходимых продуцентов CBS-пирофосфатаз на основе *Escherichia coli*, разработанные с нашим участием в лаборатории проф. Р. Лахти (Университет г. Турку, Финляндия); к ним относятся CBS-пирофосфатазы из *Clostridium novyi* (Cn-РРаза), *Clostridium perfringens* (Cp-РРаза), *Desulfitobacterium hafniense* (Dh-РРаза), *Eggerthella lenta* (El-РРаза) и *Ethanoligenens harbinense* (Eh-РРаза). Продуценты пирофосфатаз из *Bacillus subtilis* (Bs-РРаза), *Moorella thermoacetica* (Mt-РРаза) а также вариант Dh-РРаза с удаленной регуляторной вставкой (Δ CDC-Dh-РРаза) были предоставлены нам проф. Р. Лахти. Приведены также использованные нами методики очистки данных ферментов.

Глава 4. Результаты и их обсуждение

Четвертичная структура CBS-РРаза и её значение для активности

Информация об олигомерном строении CBS-РРаза была получена тремя различными методами (гель-фильтрация, химическое сшивание, аналитическое ультрацентрифугирование). Все они показали, что все полноразмерные CBS-РРаза и вариант Dh-РРаза без регуляторной вставки (Δ CDC-Dh-РРаза) являются димерами. С помощью аналитического ультрацентрифугирования также была показана диссоциация димера в присутствии ЭДТА (рис. 2). С другой стороны, в процессе инкубации с ЭДТА постепенно происходила агрегация белка до тетрамера и/или больших олигомеров.

Анализ зависимости активности CBS-РРаза от ее концентрации в запасном растворе позволил определить параметры ее диссоциации. Аппроксимация зависимости показала, что активность мономерной формы Dh-РРаза равна нулю в пределах ошибки измерения и позволила также определить константу диссоциации димера ($K_D = 0,67 \pm 0,15$ мкМ). Полноразмерный фермент

более стабилен чем фермент без регуляторной вставки (разница в K_D немного больше порядка) и дополнительно стабилизируется лигандами регуляторного центра — АТР и Ar_4A , о чем свидетельствует сдвиг кривой в более низкие концентрации фермента. Введение в систему ЭДТА приводило к полной дестабилизации полноразмерного фермента, делавшее невозможным определение величины K_D .

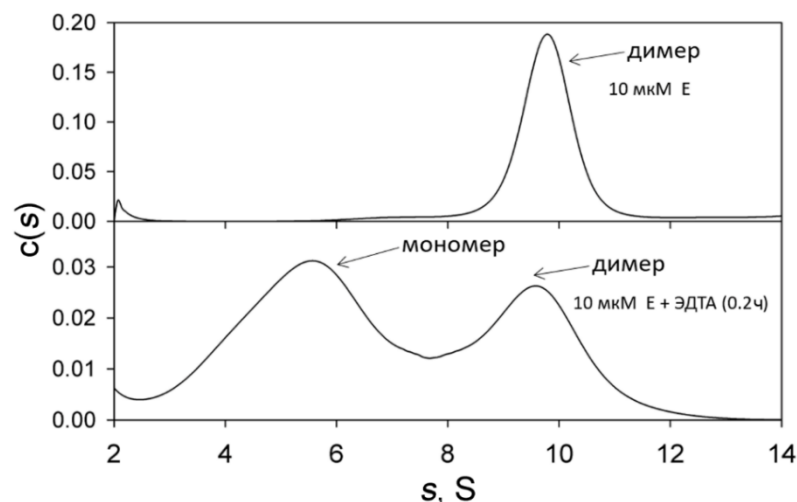


Рис. 2. Распределение коэффициентов седиментации для Dh-PPазы в отсутствие и в присутствии ЭДТА.

Отсутствие активности у мономерной формы и низкая скорость диссоциации димера позволили измерить по кривым изменения активности во времени после разбавления раствора фермента константы скорости диссоциации и ассоциации димеров для нескольких CBS-пирофосфатаз. Диссоциация была обратимой. Эффекты производных аденозина на скорость диссоциации коррелировали с влиянием на равновесную активность.

На основании этих данных был сделан вывод о том, что, CBS-PPазы, как и канонические PPазы семейства II, являются гомодимерными белками, но отличаются от последних меньшей прочностью димера. Этот результат не является тривиальным ввиду того, что CBS- и DRTGG-домены дают дополнительные межсубъединичные контакты, как следует из кристаллической структуры изолированной регуляторной вставки (Tuominen *et al.*, 2010).

Кооперативность в катализе и регуляции CBS-PPазами

Зависимость активности CBS-PPаз от концентрации субстрата проявляла систематическое отклонение от уравнения Михаэлиса-Ментен (рис. 3). Коэффициент Хилла h , полученный для этой зависимости по уравнению (1), равен $1,37 \pm 0,02$, что говорит о положительной кинетической кооперативности — связывание первой молекулы субстрата облегчает связывание второй в терминах константы Михаэлиса.

$$v = \frac{k_{\text{cat}}[E]_0}{1 + \left(\frac{K_m}{[S]}\right)^h} \quad (1)$$

Анализ данной зависимости в рамках схемы 1 позволил определить значения макроскопических констант Михаэлиса (K_{m1} и K_{m2}) для двух активных центров. Такой подход улучшал качество описания экспериментальных данных в сравнении с уравнением Михаэлиса-Ментен (рис. 3): сумма квадратичных отклонений уменьшилась в 12 раз. Значения констант Михаэлиса K_{m1} и K_{m2} оказались равными 26 ± 1 и 10 ± 1 мкМ, соответственно, а отношение $4K_{m1}/K_{m2}$ равным 10. Как известно (Bisswanger H., 2008), отношение $4K_{m1}/K_{m2}$ равно единице для некооперативного (независимого) связывания и больше единицы в случае положительной кооперативности.

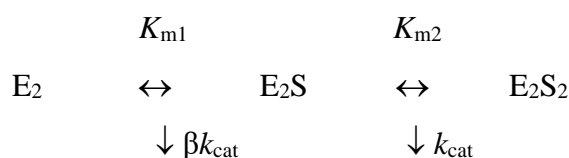


Схема 1. Связывание субстрата и его гидролиз CBS-PPазой ($S = \text{MgPP}_i$).

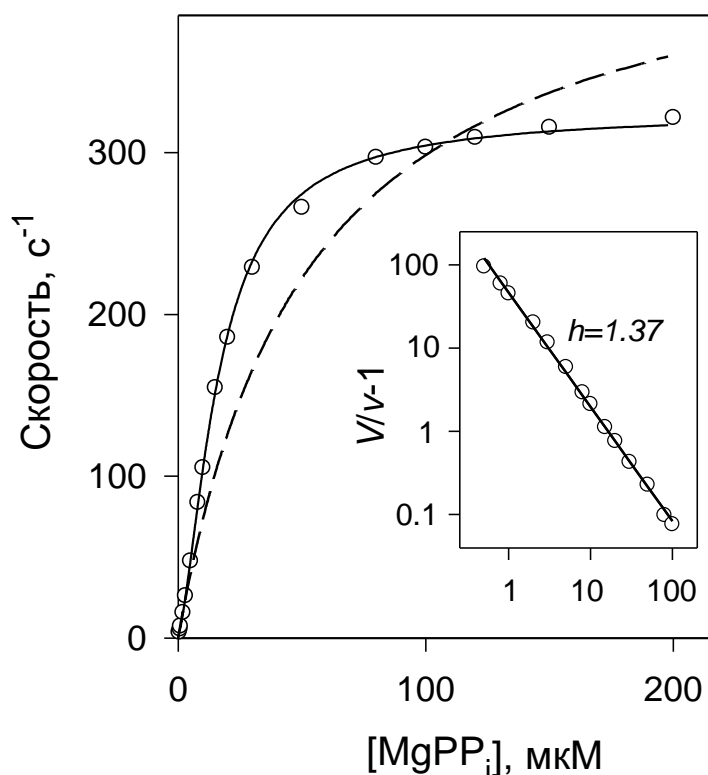


Рис. 3. Зависимость скорости гидролиза пирофосфата Dh-PPазы от концентрации субстрата в присутствии 5 мМ Mg^{2+} . Линиями показаны наилучшие аппроксимации для уравнения (1) для кооперативной кинетики (сплошная линия) и для простой схемы Михаэлиса-Ментен (штриховая линия). Вставка показывает график Хилла (обе оси логарифмические).

Коэффициент Хилла (h), как и отношение $4K_{m1}/K_{m2}$ для Dh-PPазы оказались больше единицы в широком диапазоне концентраций свободных ионов магния (рис. 4). Такой же кинетический анализ был проведен для трех других CBS-PPаз (рис. 4).

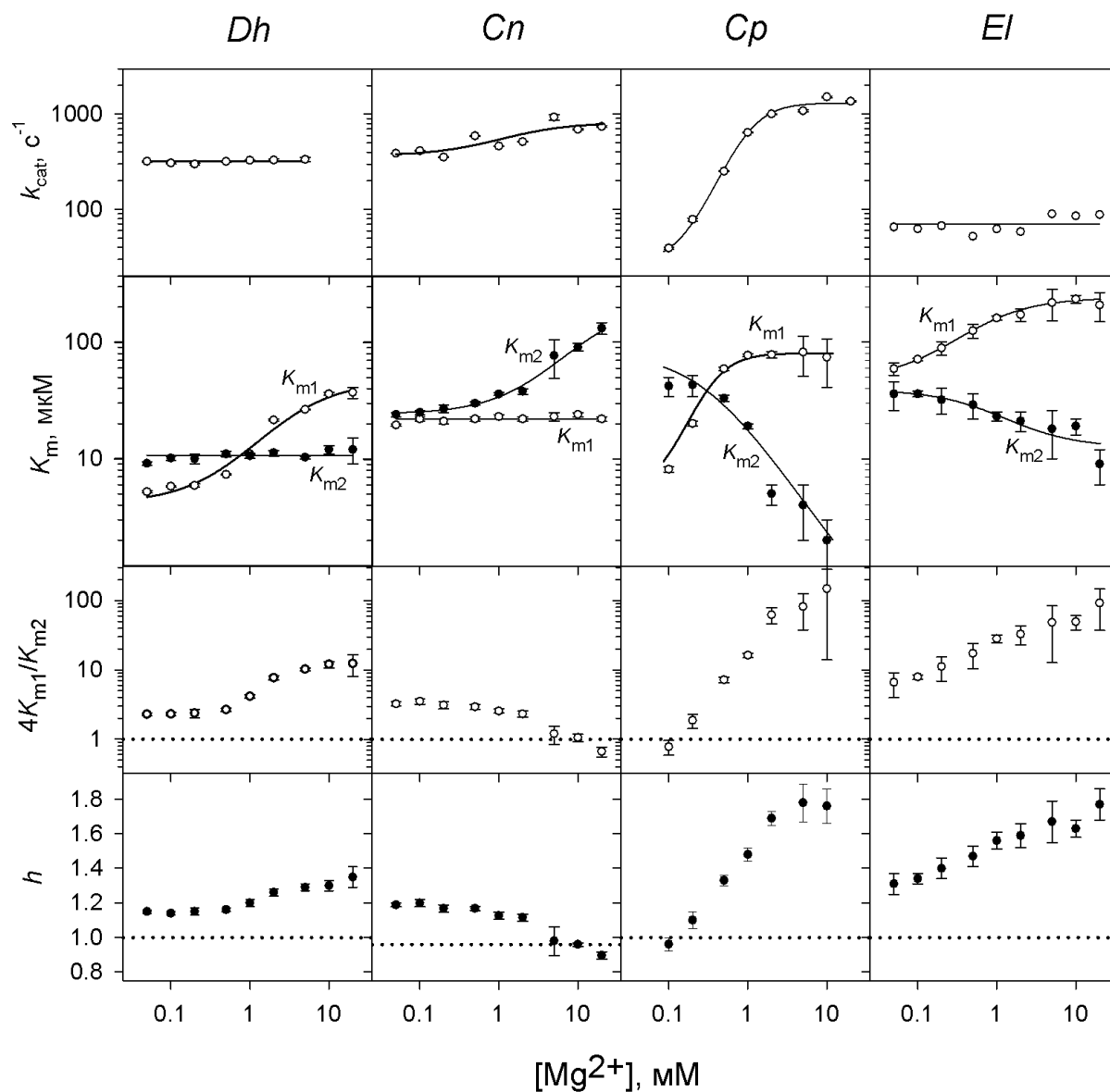


Рис. 4. Зависимость кинетической кооперативности четырёх CBS-PPаз от концентрации свободных ионов магния. Панели показывают (сверху вниз) каталитическую константу k_{cat} , константы Михаэлиса K_{m1} и K_{m2} , отношение констант Михаэлиса и коэффициент Хилла h . Происхождение белков обозначено сверху. Горизонтальные пунктирные линии ($4K_{m1}/K_{m2} = 1$ и $h = 1$) показывают границу между положительной и отрицательной кооперативностью.

Кооперативные эффекты наблюдались и для связывания аденозинолигофосфатов. На рис. 5 показано влияние концентрации аденозинолигофосфатов на активность CBS-PPаз при фиксированных концентрациях субстрата ($MgPP_i$) и ионов магния. Микромолярные концентрации АМР и АDР ингибировали активность ферментов в большинстве случаев, а АТР действовал в качестве активатора.

В большинстве случаев, когда величина эффекта позволяла провести количественный анализ, кривые описывались уравнением Хилла с коэффициентом Хилла $h > 1$. Для более адекватного описания была использована схема 2 для кооперативного связывания лигандов в двух центрах. Наилучшие аппроксимации наблюдались при $v_{1/2} = (v_0 + v_N)/2$ по сравнению с предельными случаями $v_{1/2} = 0$ или v_N .

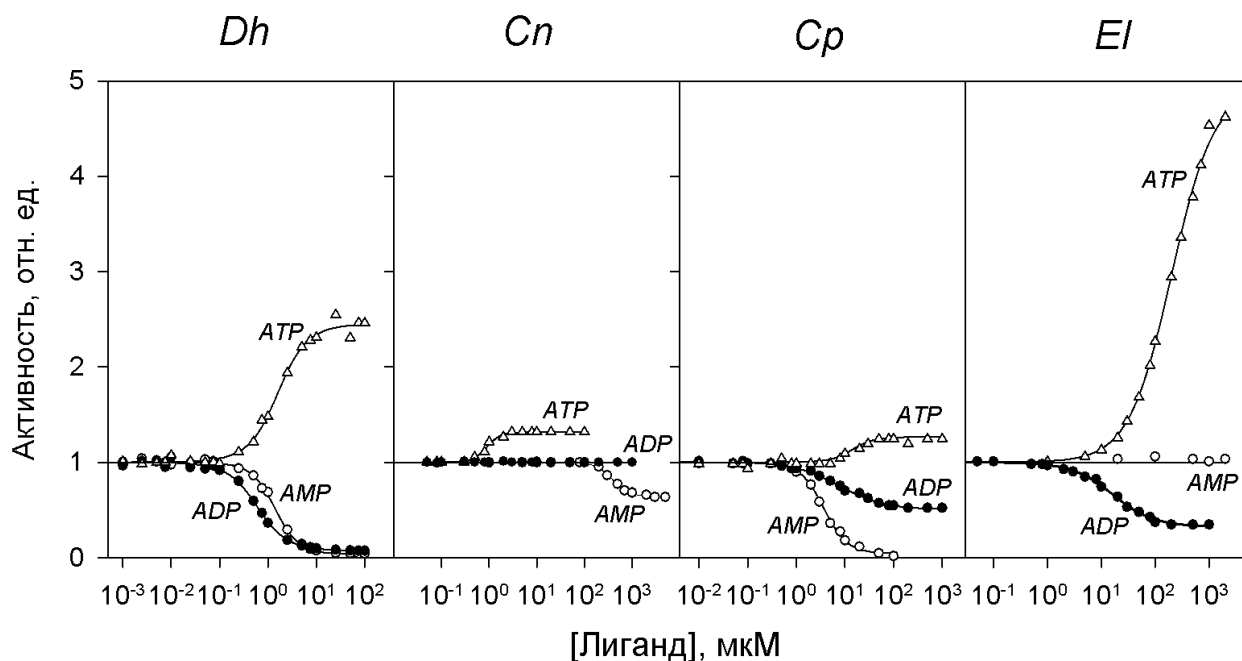


Рис. 5. Зависимости активности четырёх CBS-PPаз от концентрации аденозинолигофосфатов, полученные при фиксированных концентрациях субстрата (50 мкМ MgPP_i) и свободных ионов магния (5 мМ).

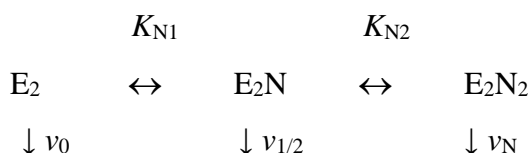


Схема 2. Модуляция активности CBS-PPазы лигандом N при постоянной концентрации субстрата.

Для большинства кривых на рис. 5 значения макроскопических констант K_{N1} превышали K_{N2} независимо от значения $v_{1/2}$ и коэффициенты Хилла (h) были больше единицы (табл. 1). Таким образом, связывание аденозинолигофосфатов также показывало положительную кооперативность. Только в двух парах (Cp-PPаза/ADP и EI-PPаза/ATP) проведенный анализ не показал значимой кооперативности. Для Dh-PPазы (AMP, ADP и ATP) и Cp-PPазы (AMP) были определены зависимости связывания от концентрации ионов магния (рис. 6).

Кооперативность связывания AMP и ATP характеризуемая параметрами $4K_{N1}/K_{N2}$ и h , не существенно зависела от концентрации субстрата в большинстве случаев (табл. 1). Таким образом,

наблюдавшаяся кооперативность связывания аденозинолигофосфатов не индуцировалась связанным субстратом или за счёт модуляции связывания последнего.

Таблица 1. Параметры, описывающие влияние аденозинолигофосфатов на четыре CBS-PPазы.

Фермент	Лиганд	[MgPP _i], мкМ	v_N/v_0^a	K_{N1} , мкМ	K_{N2} , мкМ	h
Dh-PPаза	АМР	5	$0,13 \pm 0,02$	3 ± 2	$0,3 \pm 0,2$	$1,75 \pm 0,14$
	АМР	50	$0,037 \pm 0,001$	$4,8 \pm 0,7$	$0,41 \pm 0,04$	$1,68 \pm 0,04$
	АМР	400	$0,035 \pm 0,006$	$6,7 \pm 1,5$	$0,5 \pm 0,1$	$1,74 \pm 0,05$
	АДР	5	$0,23 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,05$	$0,14 \pm 0,02$	$1,51 \pm 0,05$
	АДР	50	$0,09 \pm 0,01$	$0,99 \pm 0,09$	$0,90 \pm 0,08$	$1,34 \pm 0,03$
	АДР	400	$0,05 \pm 0,01$	$1,4 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$	$1,23 \pm 0,04$
	АТР	5	$3,2 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,3$	$0,63 \pm 0,08$	$1,55 \pm 0,04$
	АТР	50	$2,5 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,8$	$1,5 \pm 0,1$	$1,45 \pm 0,13$
	АТР	400	$2,1 \pm 0,1$	4 ± 1	$1,7 \pm 0,5$	$1,48 \pm 0,10$
Сп-PPаза	АМР	50	$0,63 \pm 0,01$	>2000	<80	$2,3 \pm 0,2$
	АДР	50	1,00	-	-	-
	АТР	50	$1,32 \pm 0,02$	н.о.	н.о.	н.о.
Ср-PPаза	АМР	50	$0,035 \pm 0,015$	12 ± 5	$1,1 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,1$
	АДР	50	$0,50 \pm 0,02$	$3,2 \pm 0,4$	18 ± 3	$0,92 \pm 0,06$
	АТР	50	$1,26 \pm 0,02$	>70	<3	$2,2 \pm 0,5$
ЕI-PPаза	АМР	50	1,00	-	-	-
	АДР	50	$0,32 \pm 0,01$	$11,1 \pm 1,6$	24 ± 4	$1,14 \pm 0,07$
	АТР	50	$5,2 \pm 0,3$	123 ± 14	380 ± 70	$1,07 \pm 0,07$

^a Параметры v_N и v_0 – активности, экстраполированные к бесконечной и нулевой концентрации лиганда соответственно.

Таким образом, наличие регуляторной вставки из CBS-доменов в CBS-PPазе приводит к появлению положительной кооперативности двух типов в механизме регуляции активности. Положительная кооперативность обеспечивает возможность модуляции активности CBS-PPазы в более узких диапазонах концентраций лигандов и субстрата. То же самое относится и к зависимости активности от концентрации субстрата. Анализ влияния аденозинолигофосфатов на кинетику гидролиза пирофосфата показал, что аденозинолигофосфаты лишь немного уменьшали кинетическую кооперативность, но не устраняли её. Ионы магния являются дополнительным фактором регуляции, поскольку они, кроме прямого влияния на активность, изменяли степень кооперативности при связывании субстрата и нуклеотидов.

Следует отметить, что в отличие от других известных CBS-белков, рассмотренные нами Dh-PPаза, Sp-PPаза и Cp-PPаза содержат дополнительный DRTGG-домен внутри пары CBS-доменов. В данной части работы мы не наблюдали каких-либо принципиальных различий в поведении этих CBS-PPаз по сравнению с EI-PPазой, которая не имеет DRTGG-домен в своей структуре.

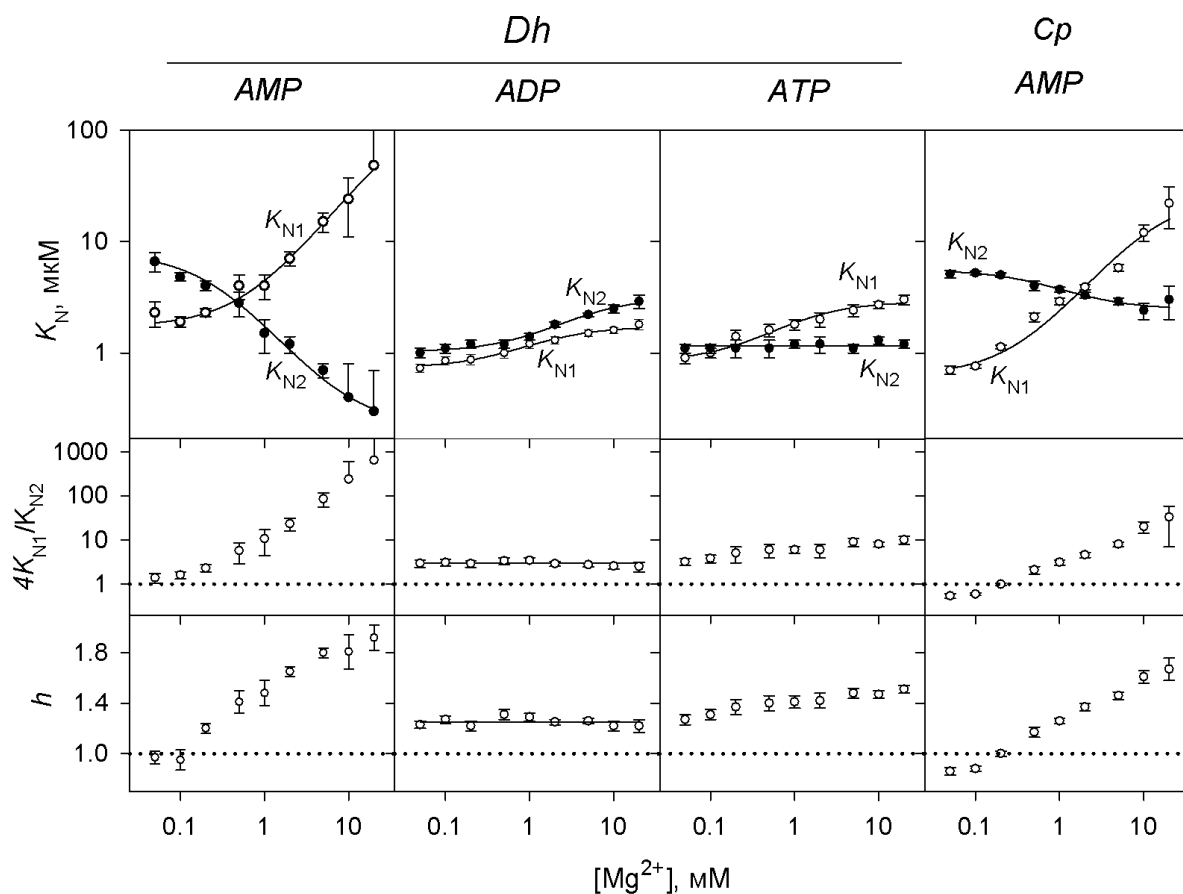


Рис. 6. Зависимость кооперативности связывания аденозинолигофосфатов с Dh- и Cp-PPазами от концентрации свободных ионов магния. Панели показывают (сверху вниз) константы связывания K_{N1} и K_{N2} , отношение констант и коэффициент Хилла h . Происхождение белков и обозначения аденозинолигофосфатов указаны сверху.

Диаденозинполифосфаты как регуляторы CBS-PPазы

В дополнение к аденозинолигофосфатам мы обнаружили ещё одну группу лигандов регуляторных центров CBS-PPаз — диаденозинполифосфаты (рис. 7). На рис. 8 приведена концентрационная зависимость влияния четырех Ar_nA ($n = 3-6$) на активность трех CBS-PPаз, при постоянных концентрациях субстрата и свободных ионов магния (50 мкМ и 5 мМ, соответственно). Примечательно, что наномолярные концентрации Ar_nA активировали все CBS-PPазы, за исключением Cp-PPазы, для которой Ar_3A был эффективен при микромолярной концентрации.

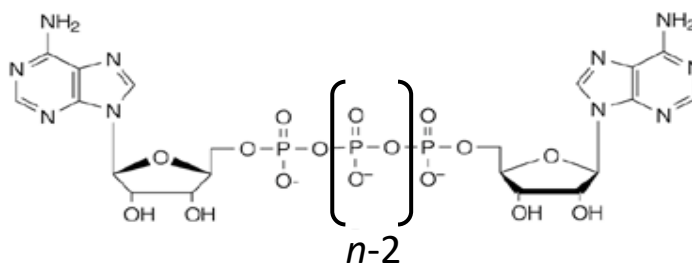


Рис. 7. Структура диаденозинполифосфатов (Ar_nA).

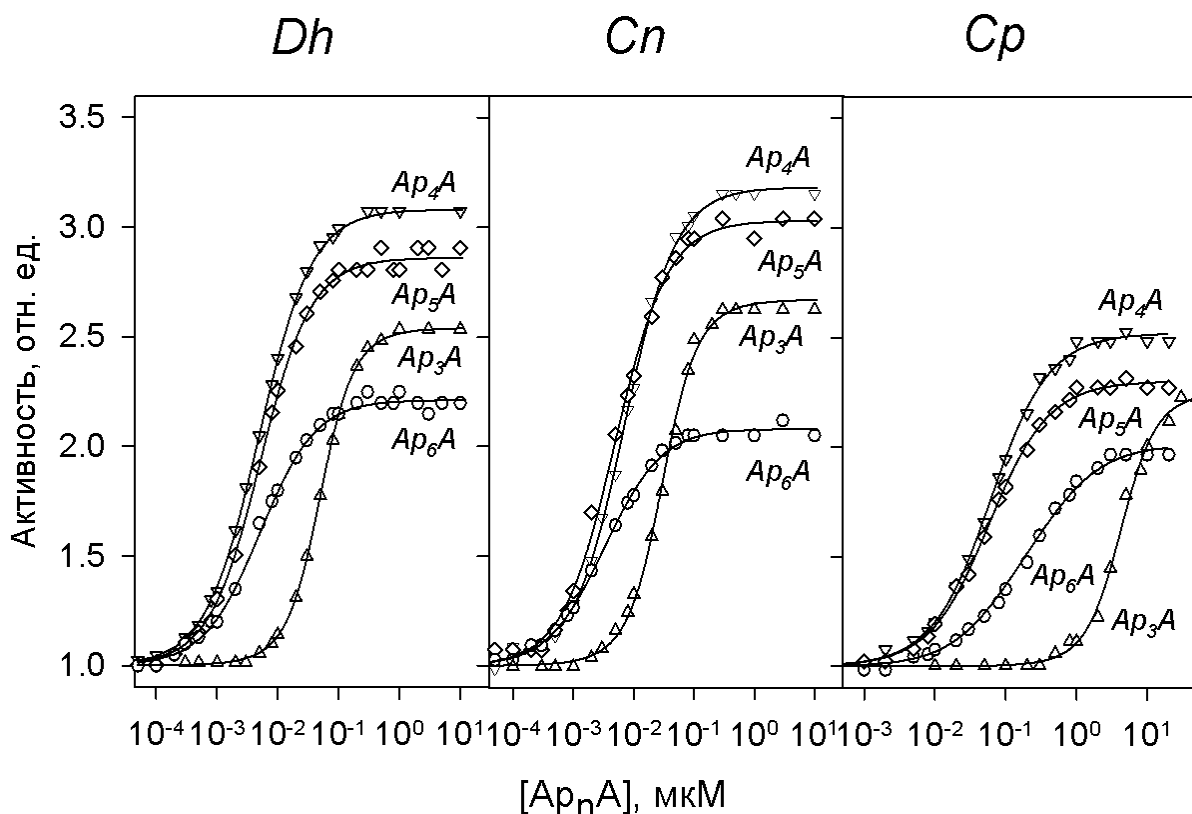


Рис. 8. Зависимости влияния Ap_nA на активность трех CBS-PPаз от концентрации лигандов при постоянных концентрациях субстрата (50 мкМ $MgPP_i$) и ионов магния (5 мМ Mg^{2+}). Активности в отсутствие Ap_nA (220, 350 и 800 s^{-1} для Dh-, Cn- и Cp-PPаз соответственно) были приняты за единицу.

Значения коэффициента Хилла для зависимостей, показанных на рис. 8, были практически неотличимы от единицы ($1,00 \pm 0,05$) при всех концентрациях субстрата для Ap_nA с $n = 4-6$. В противоположность этому, Ap_3A связывался кооперативно ($h = 1,4-1,7$) при тех же концентрациях субстрата. Поэтому данные для Ap_3A были дополнительно проанализированы в рамках схемы 2.

Сродство к Ap_3A при 50 мкМ субстрате было заметно ниже чем для других Ap_nA для всех CBS-PPаз (рис. 8). Удлинение полифосфатного мостика (увеличение n) не влияло на сродство к Dh-PPазе, немного улучшало его для Cn-PPазы и ухудшало для Cp-PPазы. Cp-PPаза связывала диаденозинполифосфаты с меньшим сродством в сравнении с другими CBS-PPазами.

Удивительно, что ни один из диаденозинполифосфатов в концентрации до 10 мкМ не влиял на активность E1- и Mt-PPаз. Эти CBS-PPазы отличаются от вышеописанных отсутствием DRTGG-домена в регуляторной части, которая сформирована только парой CBS-доменов. Более того, 10 мкМ Ap_4A не влиял на ингибирование E1- и Mt-PPаз под действием ADP, указывая на неспособность Ap_4A присоединиться к ADP-связывающему центру.

Поскольку кооперативность у CBS-PPаз зависела от концентрации свободных ионов магния, для Ap_3A и Ap_4A (как ярко различающихся по влиянию динуклеотидов) измерения, аналогичные представленным на рис. 8, были также проведены при других концентрациях ионов магния (в

диапазоне 0,05–20 мМ) и фиксированной концентрации субстрата (50 мкМ MgPP_i). Результаты этих опытов показали, что Ар₃А связывался с положительной кооперативностью, в то время как Ар₄А связывался некооперативно со всеми тремя CBS-PPазами во всем диапазоне концентраций свободных ионов магния. Только в одном случае (Dh-PPаза с Ар₃А) степень кооперативности, характеризуемая отношением констант $4K_{N1}/K_{N2}$ и коэффициентом Хилла, оказалась зависима в значительной степени от концентрации свободных ионов магния.

Степень активации (v_N/v_0) для Dh-PPазы и Cn-PPазы под действием Ар₃А и Ар₄А была практически постоянна во всем диапазоне концентраций свободных ионов магния. В противоположность этому, активация Cp-PPазы имела либо колоколообразную зависимость (Ар₃А), либо снижалась (Ар₄А) при увеличении концентрации свободных ионов магния.

Удивительно, что Ар₃А и Ар₄А полностью снимали или заметно снижали уровень кинетической кооперативности в Dh-PPазе, Cn-PPазе и Cp-PPазе, о чем свидетельствовала близость коэффициента Хилла (h) к единице (табл. 2).

Таблица 2. Кинетические параметры гидролиза пирофосфата в присутствии 50 мкМ Ар₃А (концентрация ионов магния 5 мМ).

Фермент	k_{cat} , с ⁻¹	K_{m1} , мкМ	K_{m2} , мкМ	$\sqrt{K_{m1}K_{m2}}$, мкМ	$4K_{m1}/K_{m2}$	h
Dh-PPаза	565 ± 4	1,47 ± 0,03	5,8 ± 0,3	2,94 ± 0,08	1,01 ± 0,07	1,00 ± 0,02
Cn-PPаза	1120 ± 20	5,0 ± 0,4	18 ± 3	9,5 ± 0,6	1,1 ± 0,2	1,02 ± 0,04
Cp-PPаза	3090 ± 20	12,9 ± 0,4	16,0 ± 1,0	14,5 ± 0,4	3,2 ± 0,3	1,23 ± 0,02

Использование метода изотермической калориметрии (ИТС) позволило прямо измерить изменения свободной энергии (ΔG), энтальпии (ΔH) и энтропийного фактора ($T\Delta S$) при связывании фосфатных производных аденозина с CBS-PPазами. Типичный профиль титрования представлен на рис. 9А. Результаты проведенных аналогичных титрований с различными CBS-PPазами и лигандами суммированы на рис. 9Б и табл. 3.

Одним из важных результатов являлось отсутствие какого-либо сигнала при титровании E1-PPазы и Mt-PPазы (CBS-PPаз, у которых отсутствует DRTGG-домен), вплоть до 10 мкМ Ар₄А или Ар₃А и неспособность последних активировать эти CBS-PPазы и модулировать их ингибирование под действием ADP. Поскольку данные изотермического калориметрического титрования характеризуют энергетический аспект реакции связывания, то они независимо подтверждают отсутствие образования комплекса между Ар_nА и CBS-PPазами, не содержащими DRTGG-домен. Аналогичные измерения с AMP, ADP и ATP (табл. 3) обнаружили изменения энтальпии практически во всех случаях. В совокупности эти данные позволяют заключить, что DRTGG-домен требуется для связывания CBS-PPазами диаденозинполифосфатов, но не аденозинолигофосфатов.

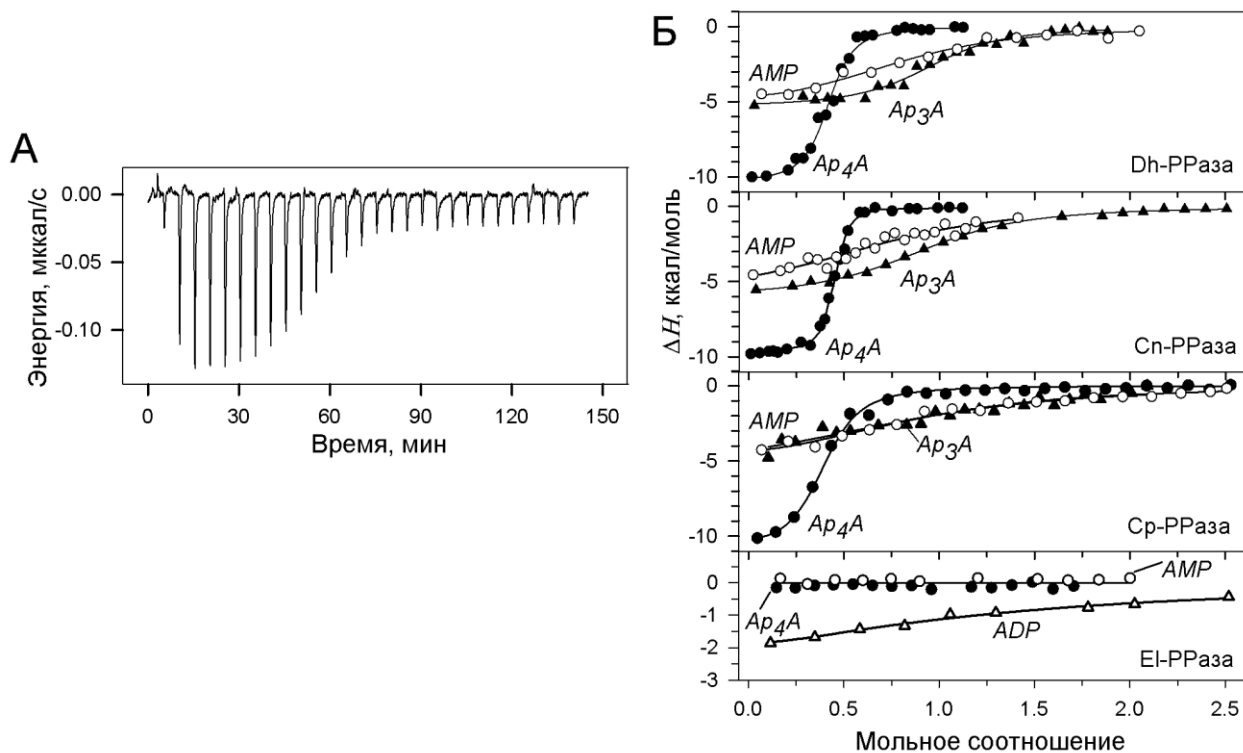


Рис. 9. ИТС–измерения связывания аденозиновых производных с CBS-PPазами. (А) Типичные исходные данные титрования Dh-PPазы раствором Ap₄A. (Б) Интегрированные данные титрования четырех CBS-PPаз разными лигандами с учетом разбавления. Концентрация ферментов была 4, 5, 3,5 и 2,5 мкМ для Dh-, Sn-, Cr- и El-PPазы соответственно. Линиями показаны лучшие аппроксимации для модели связывания в центрах одного типа.

Еще один важный вывод, заключался в том, что величина ΔH , в расчете на моль лиганда, была почти в два раза больше для Ap₄A и Ap₅A, чем для Ap₃A и аденозинолигофосфатов в титрованиях DRTGG-содержащих CBS-PPаз. Это различие коррелировало с вдвое более низкой стехиометрией связывания для Ap₄A и Ap₅A по сравнению с таковой для аденозинолигофосфатов и Ap₃A.

На основании полученных данных можно полагать, что связывание Ap_nA *in vivo* приводит к существенному изменению активности CBS-PPазы, особенно в условиях энергетического дефицита, когда концентрация альтернативного активатора, АТФ, оказывается низкой. Хотя в норме внутриклеточные концентрации Ap_nA на четыре порядка ниже, чем концентрации аденозинолигофосфатов, концентрации Ap_nA могут возрасти на два порядка в условиях стресса (Garrison et al., 1992; Plateau et al., 1994). Кроме того, принимая во внимание их чрезвычайно высокое сродство, можно ожидать, что Ap_nA будут при этом эффективно конкурировать с аденозинолигофосфатами за связывание с CBS-PPазами. Повышение активности CBS-PPазы под действием Ap_nA, приведет к снижению концентрации PP_i и таким образом уменьшит его ингибирование многочисленных биосинтетических реакций, в которых PP_i является побочным продуктом (Heinonen J.K., 2001). Сродство CBS-PPаз к Ap_nA значительно превышает сродство

любого из известных Ар_nА-связывающих белков и позволяет предположить, что CBS-РРаза является главной мишенью, связываясь с которой, Ар_nА выполняют свои функции при стрессе у бактерий. Следует отметить, что Ар_nА до этого не считались лигандами CBS-белков.

Таблица 3. Термодинамические параметры связывания лигандов с CBS-РРазами, полученные с помощью изотермической калориметрии (ИТС).

Фермент	Лиганд	K_N , мкМ	n	ΔH , ккал/моль	$-T\Delta S$, ккал/моль
Dh-РРаза	AMP	$0,8 \pm 0,3$	$0,79 \pm 0,05$	$-5,6 \pm 0,5$	$-2,7 \pm 0,6$
	ADP	$1,0 \pm 0,2$	$0,85 \pm 0,04$	$-5,9 \pm 0,4$	$-2,4 \pm 0,5$
	ATP	$1,2 \pm 0,1$	$0,80 \pm 0,02$	$-5,8 \pm 0,2$	$-2,4 \pm 0,2$
	Ар ₃ А	$0,12 \pm 0,05$	$0,97 \pm 0,02$	$-5,3 \pm 0,2$	$-4,0 \pm 0,3$
	Ар ₄ А	н.о.	$0,41 \pm 0,01$	$-10,4 \pm 0,3$	н.о.
	Ар ₅ А	н.о.	$0,41 \pm 0,01$	$-10,3 \pm 0,3$	н.о.
Cn-РРаза	AMP	$0,9 \pm 0,4$	$0,80 \pm 0,08$	$-5,9 \pm 0,9$	$-2,4 \pm 1,0$
	ADP	5 ± 1	$0,91 \pm 0,08$	$-3,0 \pm 0,6$	$-4,1 \pm 1,0$
	ATP	$0,6 \pm 0,2$	$0,89 \pm 0,07$	$-5,8 \pm 0,7$	$-2,8 \pm 1,1$
	Ар ₃ А	н.о.	$0,94 \pm 0,01$	$-6,1 \pm 0,1$	н.о.
	Ар ₄ А	н.о.	$0,44 \pm 0,01$	$-9,7 \pm 0,3$	н.о.
Cp-РРаза	AMP	$0,97 \pm 0,03$	$0,87 \pm 0,06$	$-6,0 \pm 0,6$	$-2,3 \pm 0,7$
	ADP	$2,6 \pm 0,5$	$0,94 \pm 0,09$	$-6,0 \pm 0,8$	$-1,6 \pm 0,3$
	ATP	$0,23 \pm 0,06$	$1,00 \pm 0,03$	$-5,6 \pm 0,3$	$-3,6 \pm 0,9$
	Ар ₃ А	$0,7 \pm 0,3$	$0,97 \pm 0,11$	$-5,7 \pm 1,1$	$-2,7 \pm 1,2$
	Ар ₄ А	н.о.	$0,42 \pm 0,01$	$-10,4 \pm 0,3$	н.о.
E1-РРаза	AMP	-	-	$\leq 0,1$	-
	ADP	9 ± 4	$0,95 \pm 0,11$	$-4,5 \pm 1,6$	$-2,4 \pm 2,0$
	ATP	5 ± 1	$1,0 \pm 0,4$	-8 ± 4	$-0,5 \pm 0,3$
	Ар ₃ А	-	-	$\leq 0,1$	-
	Ар ₄ А	-	-	$\leq 0,1$	-

Роль остатка аспарагина в передаче информации между каталитическими и регуляторными центрами

Поиск в базе данных генов KEGG по состоянию на ноябрь 2015 года выявил 183 бактериальных и 8 архейных последовательностей CBS-РРаз, состоящих из 423–581 остатков. Все гены, как ожидается, кодируют активные РРазы, поскольку они содержат все полярные аминокислотные остатки, найденные в активных центрах канонических РРаза семейства II (рис. 1А) (Ahn et al., 2001; Merckel et al., 2001). Во всех найденных CBS-РРазах имеется регуляторная вставка в ДНН-домен, в большинстве CBS-РРаз состоящая из двух CBS-доменов и одного DRTGG-домена (рис. 1Б и 10). Четыре гена CBS-РРаз, найденные в базе данных генов KEGG, и 19 генов CBS-РРаз,

найденные в базе данных белков NCBI, в том числе из *E. harbinense*, *M. thermoacetica* и *E. lenta*, содержат два CBS-домена без DRTGG-домена в своей структуре.

Сравнение аминокислотной последовательности Eh-PPазы с пятью CBS-PPазами, описанными ранее, выявило два других важных различия (рис. 10). Во-первых, некоторые мутации в Eh-PPазе затрагивают остатки, соответствующие лиганд-связывающим остаткам в структуре комплекса регуляторной части Cp-PPазы с AMP или Ap₄A (Tuominen et al., 2010). Так, Lys100 Cp-PPазы (взаимодействует с P^α производного аденозина) заменен глицином в Eh-PPазе. Кроме того, Val258 Cp-PPазы и петля RYRN, которые участвуют во взаимодействии (через стекинг, гидрофобные взаимодействия и водородные связи) с кольцом аденина, заменяются аспарагиновой кислотой и мотивом SAGR в Eh-PPазе. Хотя CBS-домены обычно имеют низкую консервативность остатков между видами, эти замены включают функционально важные остатки, и поэтому, как ожидается, могли серьезно повлиять на связывание лигандов с Eh-PPазой.

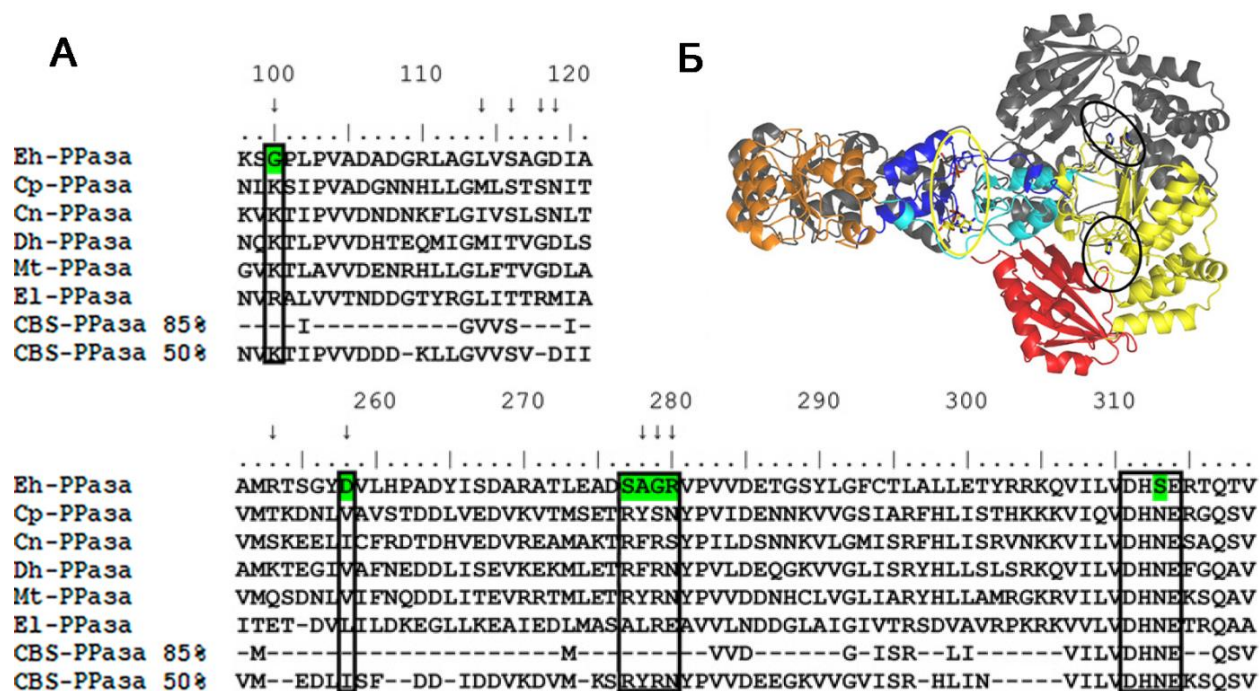


Рис. 10. Структурные аспекты пирофосфатаз семейства II. (А) Частичное выравнивание последовательностей шести CBS-PPаз. Номера остатков относятся к Cp-PPазе. Домены CBS1 и CBS2 образованы остатками 70–122 и 247–303 соответственно; остатки 311–319 (Б) относятся к DHH-домену. Остатки, отвечающие за связывание эффекторов помечены стрелками; важные заряженные остатки и мотивы выделены прямоугольниками. Важные отличия Eh-PPазы отмечены зеленым цветом. Снизу указаны консенсусные последовательности, основанные на 85 и 50% идентичности 191 CBS-PPазы. (Б) Модель структуры димера CBS-PPазы, основанная на структурах гомологичных каталитических доменов канонической пирофосфатазы семейства II и регуляторной части CBS-PPазы (Tuominen et al., 2010). Домены одной субъединицы окрашены как на рис. 1Б; вторая субъединица окрашена в серый цвет. Связанный AMP показан зеленым цветом. Активные центры и центры связывания лигандов отмечены черными и желтым овалами.

Во-вторых, высококонсервативный мотив DHNE, обнаруженный в каталитической части пяти других CBS-PPаз на рис. 10 и в большинстве других предполагаемых CBS-PPазах, заменен на DHSE в Eh-PPазе. Подобная замена наблюдается только в CBS-PPазах из *Holdemania filiformis* и *Rubrobacter xylanophilus*. Интересно, что мутация аспарагин/серин является гораздо более распространенной в канонических PPазах семейства II, у которых отсутствует регуляторная часть, и встречается примерно у половины из почти 400 обнаруженных последовательностей PPаз семейства II.

Как и выше, мы использовали для характеристики кинетической кооперативности коэффициент Хилла (h) и макроскопические константы Михаэлиса K_{m1} и K_{m2} . С учетом известной зависимости кинетической кооперативности в CBS-PPазах от концентрации свободных ионов магния, кинетические исследования были выполнены в широком диапазоне концентраций последнего (0,05–20 мМ). На основании вышеуказанных критериев, Eh-PPаз дикого штамма не проявляет существенную кинетическую кооперативность (рис. 11), что расходится с поведением четырех ранее охарактеризованных CBS-PPаз.

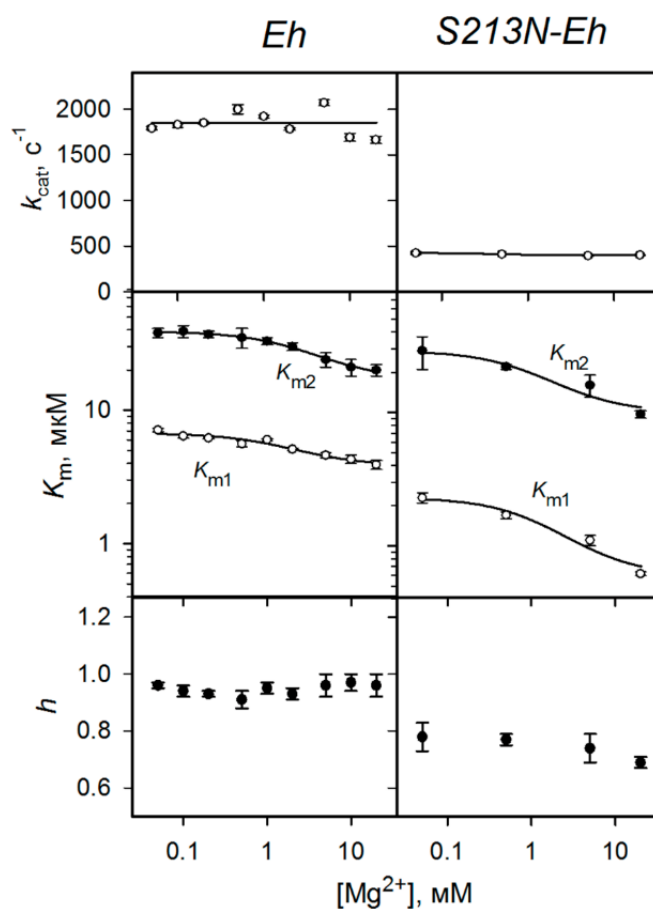


Рис. 11. Зависимость кинетической кооперативности в Eh-PPазе и S213N-Eh-PPазе от концентрации свободных ионов магния.

Примечательно, что замена S213N в Eh-PPазе привела к значительной отрицательной кооперативности, уменьшив коэффициент Хилла до 0,7; отношение $4K_{m1}/K_{m2}$ уменьшилось до приблизительно 0,3 во всем диапазоне концентраций свободных ионов магния (рис. 11). Этот эффект был, в основном, обусловлен уменьшением K_{m1} . Мутация сохранила зависимость значений обеих K_m от концентрации свободных ионов магния.

Для доказательства роли остатка аспарагина в кинетической кооперативности были проведены исследования варианта N312S-Dh-PPазы, который имитирует Eh-PPазу дикого штамма. Замена практически не повлияла на значения K_{m2} , но уменьшила K_{m1} на порядок при сохранении его зависимости от концентрации ионов магния. Как следствие, сильная положительная кинетическая кооперативность, характерная для дикого типа Dh-PPазы, исчезла полностью во всем диапазоне концентрации свободных ионов магния, на что указывают значения коэффициента Хилла и отношения констант $4K_{m1}/K_{m2}$, равные единице.

Для того, чтобы оценить влияние связывания лигандов на кинетическую кооперативность N312S-Dh-PPазы, мы измерили зависимости скорости гидролиза от концентрации субстрата для ряда фиксированных концентраций ионов магния в присутствии Ar_4A или AMP. Эти данные свидетельствовали о двух примечательных эффектах Ar_4A . Во-первых, он многократно увеличил каталитическую константу, но этот эффект был подобен наблюдаемому ранее с Dh-PPазой дикого штамма. Во-вторых, в отличие от Dh-PPазы дикого штамма, N312S-Dh-PPаза со связанным Ar_4A проявляла сильную положительную кинетическую кооперативность, так что K_{m1} превышала K_{m2} во всем диапазоне концентраций ионов магния. Коэффициент Хилла h увеличился до 1,6, а отношение констант $4K_{m1}/K_{m2}$ до 20–25. Это было неожиданным результатом, так как эффект Ar_4A на Dh-PPазу и другие CBS-PPазы был обратен: он устранял кинетическую кооперативность. Кроме того, оба значения K_m уменьшались с увеличением концентрации ионов магния в N312S-Dh-PPазе, в то время как K_{m1} увеличивалась, а K_{m2} оставалась постоянной в Dh-PPазе дикого штамма. Важно, что замена N312S не изменяла спектр кругового дихроизма в дальней ультрафиолетовой области и седиментационный профиль Dh-PPазы, что исключило большое изменение третичной или четвертичной структуры в качестве объяснения описанных эффектов. Связывание AMP не вызывало появления кинетической кооперативности в N312S-Dh-PPазе.

Почему Ar_4A устраняет кинетическую кооперативность в CBS-PPазе дикого штамма, но вызывают ее в мутантном варианте фермента, и почему мононуклеотиды не влияют на оба типа кооперативности? В отличие от аденозинолигофосфатов, Ar_4A связывается двумя аденозиновыми группами с регуляторными центрами обеих субъединиц, что делает структуру димерной CBS-PPазы более жесткой. Можно поэтому предположить, что взаимодействие субъединиц в природном

ферменте должно быть соответствующим образом сбалансировано, чтобы обеспечить передачу конформационных изменений между ними.

Анализ влияния АМР и Ар₄А на активность и титрование методом изотермической калориметрии показали, что параметры связывания лигандов практически не изменились: АМР связывался кооперативно, а Ар₄А — некооперативно; стехиометрия связывания не изменилась (2 : 1 для АМР и 1 : 1 для Ар₄А в расчете на димер CBS-PPазы).

Молекулярно-динамическое моделирование подтвердило важность остатка аспарагина для взаимодействия активных центров CBS-PPазы

Для того, чтобы получить представление о структурной роли остатка аспарагина, мы проанализировали известную трехмерную структуру гомодимера Vs-PPазы (*Fabrichniy et al., 2007*). Субъединица этой PPазы семейства II образована только двумя каталитическими доменами, которые гомологичны ДНН- и ДННА2-доменам CBS-PPаз (44% идентичных и 75% похожих остатков), имеет идентичный активный центр, и расположенный поблизости остаток аспарагина (Asn77) в консервативном мотиве DHNE. Фермент проявляет слабую, но статистически значимую кинетическую кооперативность ($h = 1,14 \pm 0,02$). Структура Vs-PPазы определена с разрешением 1,75 Å (рис. 12А).

Межсубъединичные контакты в Vs-PPазе формируются за счёт тяжа β6 и петли (остатки 96–109), которая соединяет тяжи β5 и β6 ДНН-домена (рис. 12А). Поскольку взаимодействующие тяжи β6 из двух субъединиц являются частями объединенного β-листа из 12 тяжей, который проходит через оба ДНН-домена, то указанная петля является наиболее вероятным кандидатом для передачи конформационных изменений через интерфейс субъединиц. В согласии с этим предсказанием, замена N77S не влияла на четыре водородные связи, соединяющие кристаллографически несимметричные тяжи β6, но серьезно нарушала взаимодействие между петлями. Так, в структуре Vs-PPазы дикого штамма петля образует десять водородных связей с другой субъединицей (рис. 12Б). В мутантной форме Vs-PPазы большую часть межсубъединичных водородных связей петли потеряна: были обнаружены только связи Ile100–Thr105 (O...N и N...O_γ) и Arg99–Thr105. (N_ω...O) (рис. 12В). Кроме того, было обнаружено усиление внутрисубъединичных водородных связей между Arg112 тяжа β6 и Glu129 спирали α5 по сравнению со структурой дикого штамма. Как следствие, ДНН-домены оказались повернутыми в мутантной Vs-PPазе по отношению друг к другу на 15° (рис. 12Г).

Резкое изменение в межсубъединичных водородных связях явно произошло в результате изменившихся водородных связей остатка 77. В кристаллической структуре Vs-PPазы дикого штамма, боковая цепь Asn77 каждой субъединицы участвует в трех водородных связях в

одинаковых субъединицах: с Asp96 (N δ ...O δ 2), Arg99 (N δ ...O) и Ala101 (O δ ...N). Arg99 и Ala101 относятся к петле 96–109, в то время как Asp96 является частью консервативного мотива DHH в активном центре. Все эти водородные связи Asn77 сохранились в моделированной структуре Bs-PPазы дикого штамма (рис. 12Б), в то время как остаток Ser77 в мутантной форме образует только

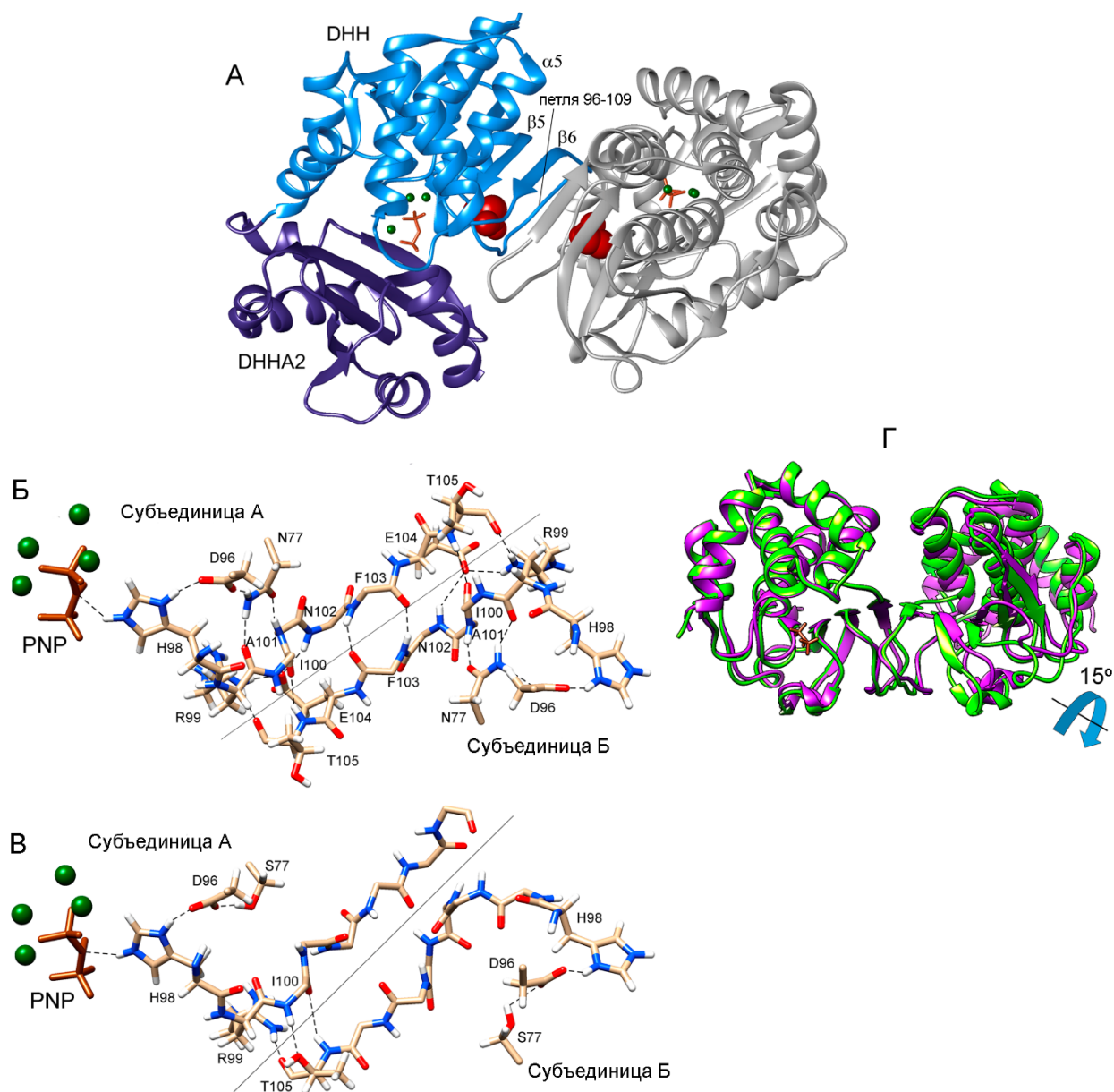


Рис. 12. (А) Кристаллическая структура димера Bs-PPазы в комплексе с PNP (показан оранжевым цветом) и четырьмя ионами магния (зеленые сферы) (код PDB: 2HAW). Домены белка (окрашены в различные цвета), петля 96–109, тяжи β 5 и β 6, и спираль α 5 обозначены для одной субъединицы. Asn77 показан красными сферами в обеих субъединицах. (Б) и (В) Контакт петель 96–109 в равновесной симулированной структуре WT (Б) и варианта N77S (В) Bs-PPазы. (Г) Сравнение пар DHH-доменов симулированной структуры WT (окрашены в зеленый цвет) и варианта N77S (окрашены в фиолетовый цвет) Bs-PPазы. Структуры совмещены по их левым DHH-доменам, содержащим PNP. Стрелкой указано направление поворота правого DHH-домена варианта N77S относительно WT Bs-PPазы.

одну водородную связь: с Asp96 (Oγ...Oδ2) (рис. 12B). Кроме того, водородная связь Ser77 позиционирует этот остаток иначе по отношению к Asp96 из-за различных размеров боковых цепей серина и аспарагина. Поэтому мотив DHNE в диком штамме и мотив DHSE в мутанте Bs-PPазы имели почти идентичные структуры (RMSD 0,4 Å), но мотив DHSE был смещен приблизительно на 4 Å в мутантном ферменте.

CBS домены, обнаруженные во многих белках, известны своей способностью связывать разнообразные производные аденозина и таким образом регулировать активности своих белков-носителей (CBS-белков). Установление механизма регуляции является важным для понимания работы CBS-белков. Можно надеяться, что обнаруженные закономерности влияния CBS-доменов в CBS-PPазах проявляются и в других CBS-белках.

ВЫВОДЫ

1. CBS-PPаза является гомодимерным белком, который диссоциирует на неактивные субъединицы при разбавлении.
2. Димерная CBS-PPаза проявляет положительную кинетическую кооперативность: связывание субстрата в одном активном центре облегчает его связывание в другом. Степень кооперативности зависит от концентрации ионов магния.
3. Положительная кооперативность проявляется также в связывании аденозинолигофосфатов и диаденозинтрифосфата в регуляторных центрах CBS-PPазы; степень кооперативности также зависит от концентрации ионов магния.
4. Наномолярные концентрации диаденозинполифосфатов (Ar_nA , $n = 3-6$) активируют CBS-PPазы, содержащие DRTGG-домен и устраняют кинетическую кооперативность. Все Ar_nA , за исключением Ar_3A , связываются некооперативно со стехиометрией 1:1 в расчете на димерный белок; стехиометрия связывания Ar_3A и адениновых мононуклеотидов составляет 2:1.
5. CBS-PPаза *E. harbinense* содержит Ser вместо Asn в консервативном мотиве DHNE и не проявляет кинетическую кооперативность. Аналогичная замена Asn/Ser в «кооперативной» CBS-PPазе *D. hafniense* также устраняет кинетическую кооперативность.
6. Молекулярно-динамическое моделирование структуры гомолога CBS-PPазы без регуляторной вставки показало, что замена Asn на Ser вызывает относительное смещение каталитических ДНН-доменов и ослабляет межсубъединичный контакт, затрудняя передачу информации между активными центрами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Salminen A.*, Anashkin V.A.*, Lahti M., Tuominen H.K., Lahti R., and Baykov A.A. Cystathionine β -synthase (CBS) domains confer multiple forms of Mg^{2+} -dependent cooperativity to family II pyrophosphatases. // J. Biol. Chem. — 2014. — V. 289 — No 33. — P. 22865-22876.
* равнозначные первые авторы.
2. Anashkin V.A., Salminen A., Tuominen H.K., Orlov V.N., Lahti R., and Baykov A.A. Cystathionine β -synthase (CBS) domain-containing pyrophosphatase as a target for diadenosine polyphosphates in bacteria. // J. Biol. Chem. — 2015. — V. 290 — No 46. — P. 27594-27603.
3. Anashkin V.A., Salminen A., Vorobjeva N.N., Lahti R., Baykov A.A. An asparagine residue mediates intramolecular communication in nucleotide-regulated pyrophosphatase. // Biochem. J. — 2016. — V. 473 — No 14. — P. 2097-2107.
4. Анашкин В.А. Кооперативность и регуляция в нуклеотид-связывающих пирофосфатазах // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2015» [Электронный ресурс]. — М.: МАКС Пресс, 2015. — 1 электрон. опт. диск. (DVD-ROM). 2015. Москва, Россия.

http://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2015/data/section_32_7119.htm