

УДК 548.73

БЕЛОК С НЕИЗВЕСТНОЙ ФУНКЦИЕЙ ИЗ БАКТЕРИИ *VARIOVORAX PARADOXUS* СПОСОБЕН ОБРАЗОВЫВАТЬ ОСНОВАНИЕ ШИФФА С МОЛЕКУЛОЙ PLP ПРИ АМИНОКИСЛОТНОЙ ЗАМЕНЕ N174K

© 2024 г. И. О. Илясов¹, М. Е. Миняев², Т. В. Ракитина³, А. К. Бакунова¹,
В. О. Попов¹, Е. Ю. Безсуднова¹, К. М. Бойко^{1,*}

¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия

²Институт органической химии РАН, Москва, Россия

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

*E-mail: kmb@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 24.08.2024 г.

После доработки 24.08.2024 г.

Принята к публикации 12.09.2024 г.

Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые ферменты являются одной из наиболее широко представленных групп ферментов в организме, где выполняют более 150 различных каталитических функций. На основании трехмерной структуры представители этой группы подразделяются на семь (I–VII) различных типов укладки. Связывание кофактора у этих ферментов происходит за счет образования основания Шиффа с консервативным остатком лизина, находящимся в активном центре. Недавно обнаруженный нами белок из бактерии *Variovorax paradoxus* (VAPA), относящийся по структуре к IV типу укладки и имеющий значительное структурное сходство с трансаминазами, содержит остаток аспарагина в положении каталитического лизина у трансаминаз IV типа укладки и, как следствие, не может образовывать основание Шиффа с PLP и не имеет аминотрансферазной активности. В работе получена мутантная форма белка VAPA с заменой N174K и установлена ее пространственная структура. Анализ полученных данных показал, что введенная мутация восстанавливает способность VAPA образовывать основание Шиффа с кофактором.

DOI: 10.31857/S0023476124060075, EDN: YNTZPU

ВВЕДЕНИЕ

Большинство известных ферментов с уникальной активностью произошло из ранее существовавших ферментов с другой функцией, относящихся к тому же типу пространственной укладки [1]. В качестве примера можно привести пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые ферменты, представители которых, относящиеся к одному из семи (I–VII) типов пространственной укладки, могут катализировать различные типы реакций, несмотря на структурную гомологию [2, 3].

К суперсемейству PLP-зависимых ферментов IV типа укладки относятся 4-амино-4-дезоксигоризматлиазы (EC 4.1.3.38) и трансаминазы трех канонических семейств, а именно трансаминазы D-аминокислот (EC 2.6.1.21), трансаминазы разветвленных L-аминокислот (EC 2.6.1.42), (R)-амин:пируваттрансаминазы (EC 2.6.1.X) [3–6]. К данному суперсемейству был ранее отнесен

белок VAPA, ген которого обнаружен в геноме β-протеобактерии *Variovorax paradoxus* штамма B4 при биоинформатическом поиске PLP-зависимых трансаминаз [1]. Отличительной особенностью данного белка являлась замена в его аминокислотной последовательности консервативного у PLP-зависимых ферментов каталитического остатка лизина на аспарагин (N174 по нумерации VAPA). Остаток лизина необходим для образования основания Шиффа с PLP и проведения каталитического цикла у большинства известных PLP-зависимых ферментов [1, 7], исключения крайне редки [8]. Проведенный ранее структурный анализ показал, что помимо высокого уровня сходства по первичной последовательности с PLP-зависимыми трансаминазами IV типа VAPA имеет с ними значительное сходство по трехмерной структуре [1]. Более того, согласно структурным данным, VAPA сохранил в кристалле способность связывать PLP без образования основания Шиффа [1]. Тем не менее

Таблица 1. Кристаллографические данные и параметры съемки кристалла варианта VAPA^{N174K}

Пр. гр.	<i>I</i> 121
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , Å	94.25, 87.34, 104.65
α , β , γ , град	90.00, 99.45, 90.00
λ , Å	1.54
<i>T</i> , К	100
Диапазон разрешений, Å	21.81–2.20 (2.27–2.20)
Число уникальных рефлексов	42508 (3658)
Полнота набора, %	99.8 (99.6)
Повторяемость	13.3 (13.8)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	11.7 (1.90)
<i>R</i> _{meas} , %	23 (143)
CC1/2, %	100 (85)

Примечание. В скобках приведены значения для данных высокого разрешения.

оставался открытым вопрос о способности белка связывать кофактор при наличии лизина в его консервативном положении в предполагаемом активном центре.

Для решения поставленной задачи в настоящей работе получили структуру мутантного варианта белка (VAPA^{N174K}), имеющую остаток лизина в позиции, соответствующей каталитическому лизину функциональных PLP-зависимых трансаминаз. Проведенный сравнительный структурный анализ показал, что остаток лизина в варианте VAPA^{N174K} способен образовывать основание Шиффа с PLP по типу трансаминаз, а также выявил уникальные по отношению к классическим трансаминазам остатки, координирующие кофактор в активном центре белка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Очистка и выделение белка. Получение кристаллов холофермента. Очистку и выделение белка VAPA^{N174K} проводили по протоколу, описанному ранее [1]. Для хранения и кристаллизации в очищенный раствор VAPA^{N174K} добавляли 1 мМ PLP.

Для поиска начальных условий кристаллизации был проведен скрининг условий с использованием роботизированной системы кристаллизации Rigaku (USA) и коммерческого набора PegIon HT (HamptonResearch, USA). Концентрация белка составила 20 мг/мл, кристаллизационный скрининг проводили методом газовой диффузии (вариант “сидячая капля”). Для улучшения качества и размера полученных кристаллов была проведена оптимизация условий с использованием метода газовой диффузии (вариант “висячая капля”). Кристаллы, пригодные для рентгеноструктурного

Таблица 2. Данные уточнения структуры варианта VAPA^{N174K}

<i>R</i> _{fact} , %	21.2
<i>R</i> _{free} , %	27.1
Общий <i>B</i> -фактор, Å ²	38.79
Средний <i>B</i> -фактор по белку, Å ²	41.85
Средний <i>B</i> -фактор по растворителю, Å ²	29.59
Число неводородных атомов	
Белок	6773
Лиганды	1
Растворитель	203
Всего	6977
Среднеквадратичные отклонения	
RMSD связей	0.014
RMSD углов	2.245
График Рамачандрана	
Наиболее благоприятные, %	97.9
Допустимые, %	2.0
Код PDB	9J32

эксперимента, росли в течение двух недель в следующих условиях: 12% *v/v* Tacsimate, pH 7.0, 16% Polyethylene glycol 3.350 при температуре 288 К.

Рентгеноструктурное исследование VAPA^{N174K} проводили при температуре 100 К, кристаллы были предварительно криопротектированы 20%-ным раствором глицерина путем обмакивания в него на 10 с. Сбор дифракционных данных проводили на лабораторном дифрактометре Rigaku D XtaLAB Synergy-S (ИОХ РАН, Москва) с использованием детектора HyPix-6000HE (табл. 1), обработку полученных данных – с использованием программного комплекса CrysAlisPro (v.171.42.102a) и программы Aimless [9].

Решение, уточнение и анализ пространственной структуры VAPA^{N174K}. Решение полученной структуры мутантного варианта VAPA^{N174K} было проведено методом молекулярного замещения при помощи программы MOLREP [10] из пакета CCP4 [11]. В качестве стартовой модели использовали полученную заранее структуру белка VAPA дикого типа из *Variovorax paradoxus* (VAPA^{wt}, PDB ID: 7Z79).

Кристаллографическое уточнение структуры было проведено с использованием программ Refmac5 [12] и Coot [13] из пакета CCP4 (табл. 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение, кристаллизационный скрининг и оптимизация мутантного варианта VAPA^{N174K}. Вариант VAPA^{N174K} из растворимой фракции клеточного

лизата был очищен до гомогенности (данные не приведены). Молекулярная масса очищенного фермента, определенная методом гель-фильтрации, составила 197 кДа, что соответствует гомогексамерному состоянию фермента, как это было и для VAPA^{wt} [1].

Для поиска начальных условий кристаллизации варианта VAPA^{N174K} провели широкий скрининг условий кристаллизации, по результатам которого были найдены следующие первоначальные условия кристаллизации: 4% v/v Tacsimate, pH 7.0, 12% Polyethylene glycol 3.350.

С целью улучшения качества и размера полученных кристаллов варианта VAPA^{N174K} провели оптимизацию найденных в ходе скрининга условий, заключающуюся в варьировании параметров кристаллизационной системы (концентрация осадителя и молярность раствора) в области найденных ранее условий. По результатам проведенной оптимизации для варианта VAPA^{N174K} найдены следующие условия кристаллизации: 12% v/v

Tacsimate, pH 7.0, 16% Polyethylene glycol 3.350, кристаллы из которых были использованы в рентгеноструктурном эксперименте (рис. 1).

Анализ пространственной структуры варианта VAPA^{N174K}. Структура VAPA^{N174K} получена с разрешением 2.2 Å. В независимой части элементарной ячейки кристалла находились три молекулы белка, две из которых образовывали димер, подобный функциональным димерам трансминаз. Все три субъединицы были весьма схожи друг с другом (RMSD между ними не превышало 0.1 Å по C_α-атомам). Анализ кристаллических контактов показал, что мутантная форма белка в кристалле является гексамером, представляющим собой тример димеров, также как и VAPA^{wt} [1]. Субъединица варианта VAPA^{N174K} включает в себя малый N-концевой (остатки 1–140 и 310–314) и большой С-концевой (остатки 152–309) домены (рис. 1). Междоменная петля (остатки 141–151) в структуре VAPA^{N174K} частично находится в форме α-спирали (остатки 147–151), как и в случае с VAPA^{wt}. При этом остатки

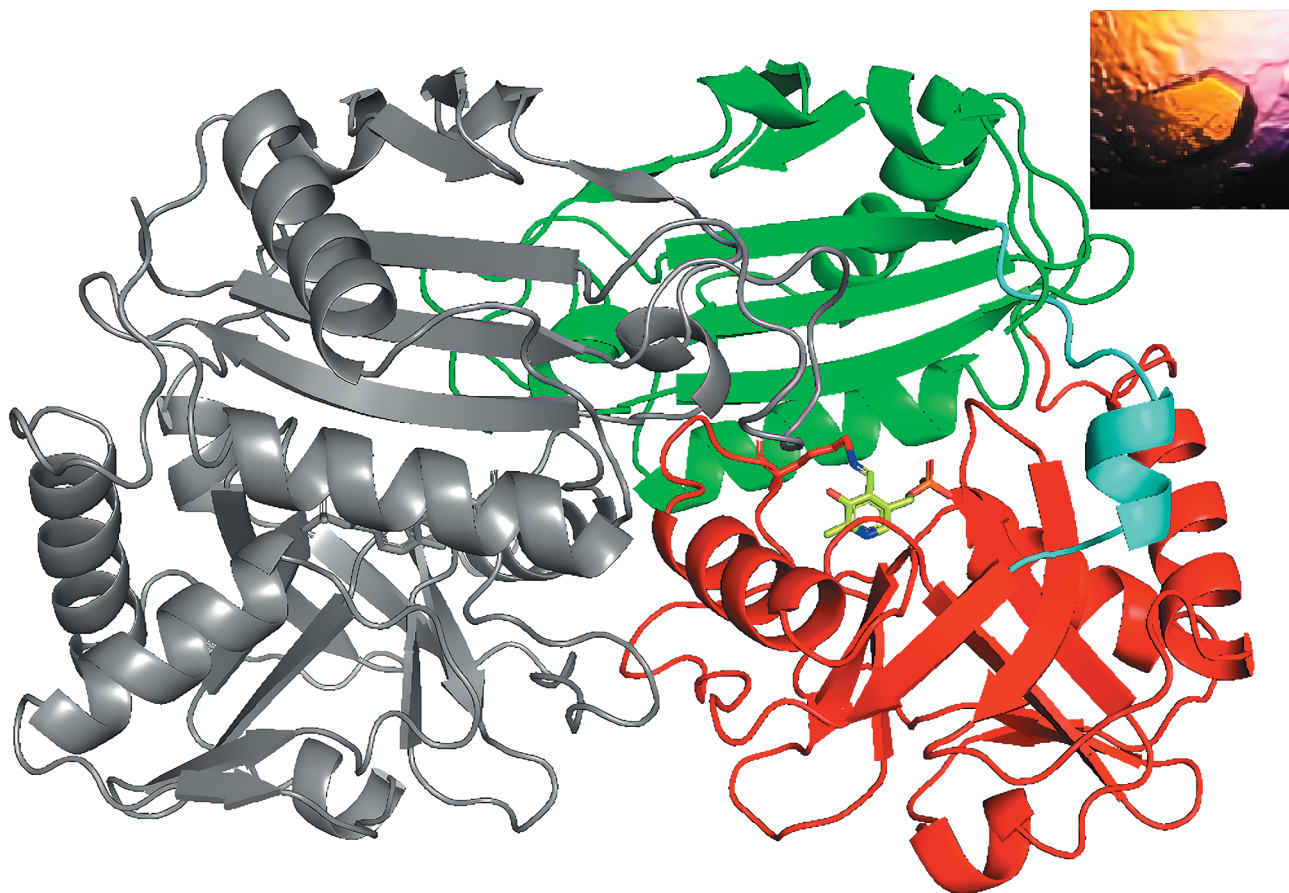


Рис. 1. Структура димера варианта VAPA^{N174K}. N-концевой домен показан зеленым цветом, С-концевой домен — красным, междоменная петля — светло-зеленым, а соседняя субъединица — серым. Молекула PLP, ковалентно связанная с остатком K174, показана желтым цветом для одной из субъединиц. На врезке справа сверху приведена фотография кристалла варианта VAPA^{N174K}, использованного в рентгеноструктурном эксперименте.

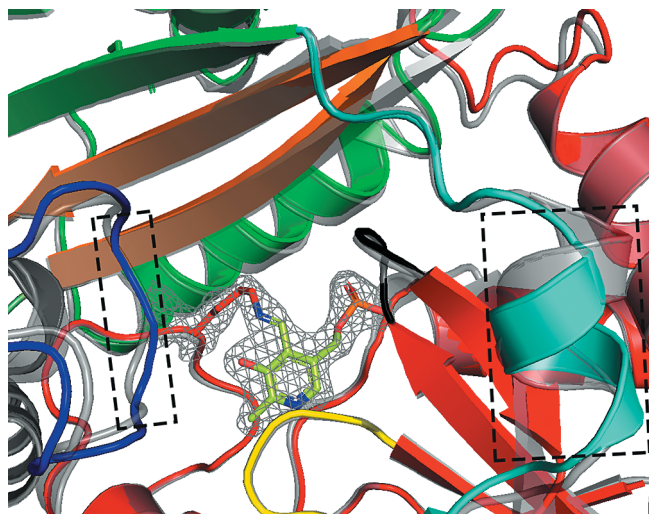


Рис. 2. Структурные различия варианта $VAPA^{N174K}$ (цветовая схема аналогична рис. 1) и $VAPA^{wt}$ (полупрозрачный серый, PDB ID: 7Z79) в предполагаемом активном центре. Электронная плотность (карта $2Fo-Fc$) для внутреннего альдимины показана сетчатой поверхностью (уровень срезки 1σ), пунктиром обозначены участки, отличающиеся по конформации от таковых у $VAPA^{wt}$. Дополнительные цветовые коды: синий – петля О-кармана, образованная остатками соседней субъединицы; оранжевый – β -X- и β -Y-тяжи N-концевого домена; черный – β -поворот С-концевого домена; желтый – последовательность CNST, представляющая собой петлю с мотивом GAGE у других трансаминаз [1].

междоменной петли имеют относительно слабую электронную плотность и высокие тепловые факторы во всех субъединицах, что отражает подвижность этих участков.

Остаток K174 имеет четкую электронную плотность, ϵ -аминогруппа остатка лизина образует основание Шиффа с молекулой PLP (рис. 2). Положение ключевых мотивов предполагаемого активного центра варианта $VAPA^{N174K}$ в целом осталось неизменным относительно структуры $VAPA^{wt}$ (рис. 2), за исключением участков 146–151 междоменной петли, представляющих собой α -спираль (RMSD = 1.55 Å), и остатков петли О-кармана 122–125, которые участвуют в формировании его полости (RMSD = 0.99 Å) (рис. 2). Данные изменения, вероятно, являются следствием образования внутреннего альдимины PLP в структуре $VAPA^{N174K}$.

Как и в структуре $VAPA^{wt}$, фосфатная группа PLP у $VAPA^{N174K}$ координируется характерными для трансаминаз IV типа укладкой взаимодействиями с боковыми группами остатков R73, T234 и T270, а также с атомами азота основной цепи остатков I233 и T220 (рис. 3). В структуре $VAPA^{wt}$ боковая цепь остатка F230 имеет двойную конформацию, что, предположительно, затрудняет (но не полностью препятствует) связывание PLP [1]. В структуре

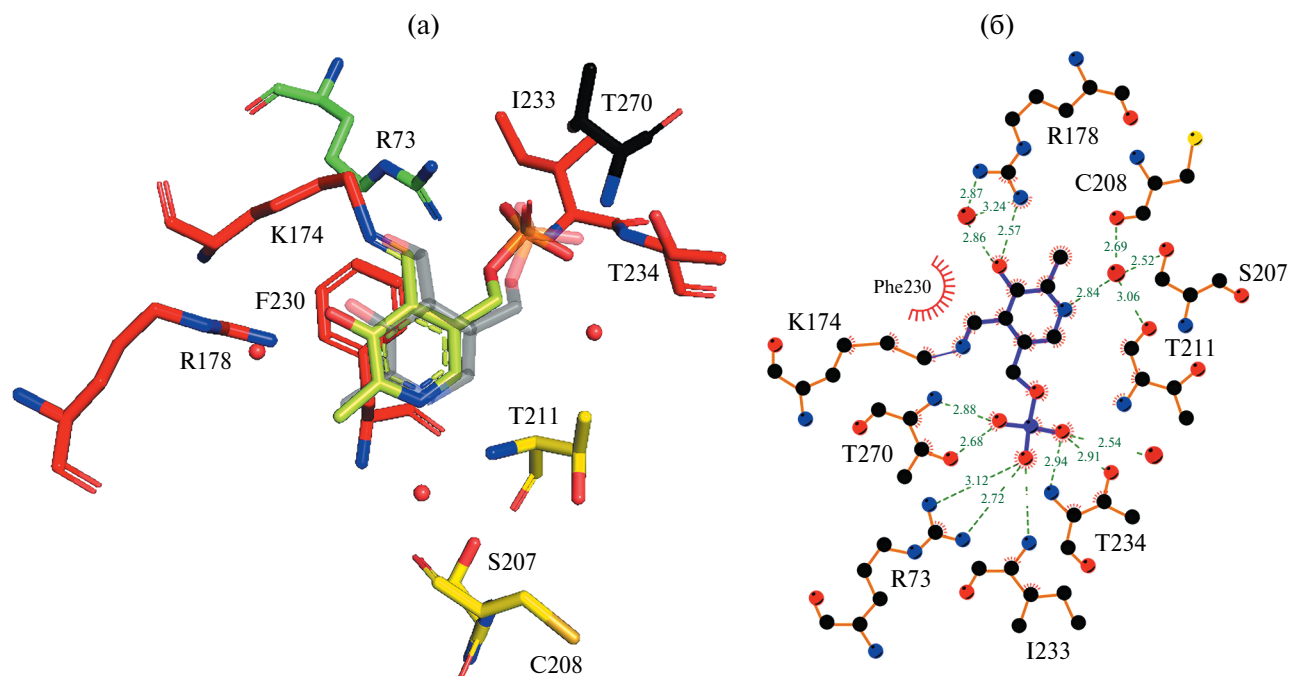


Рис. 3. Аминокислотные остатки, принимающие участие в связывании PLP в структуре варианта $VAPA^{N174K}$: а – пространственное расположение остатков, цветовая схема аналогична рис. 2. Молекулы растворителя показаны красными сферами. Для сравнения серым полупрозрачным цветом показано положение молекулы PLP в структуре $VAPA^{wt}$; б – схема связывания молекулы PLP, сделанная с помощью LigPlot [15]. Водородные связи показаны зеленой пунктирной линией с указанием соответствующих расстояний в ангстремах.

варианта VARA^{N174K} этот остаток стабилизирован в одной конформации, что открывает карман для связывания PLP, пиридиновое кольцо которого расположено на расстоянии 3.7 Å от F230 и стабилизируется боковой группой последнего посредством стекинг-взаимодействий (рис. 3). Отметим, что некоторые взаимодействия кофактора и белка необычны для трансаминаз IV типа. Так, атом N1 пиридинового кольца кофактора у этих ферментов обычно координируется отрицательно заряженным остатком аспартата или глутамата с длинной боковой группой [6], тогда как гидроксильная группа PLP образует водородную связь с остатком тирозина [3, 5]. Позицию аминокислотного остатка, стабилизирующего N1 пиридинового кольца, у VARA занимает остаток серина, боковая группа которого в данном случае слишком коротка для того, чтобы напрямую стабилизировать кофактор водородной связью, но остаток S207 взаимодействует опосредованно, через молекулу воды (рис. 3). Атом кислорода O3' PLP в варианте VARA^{N174K} образует водородную связь с боковой группой остатка R178. Аналогичный остаток аргинина, координирующий гидроксильную группу PLP, встречается у некоторых 4-амино-4-дезоксихоризматлиаз [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получен мутантный вариант белка с неизвестной функцией из бактерии *Variovorax paradoxus* (VARA^{N174K}) и установлена его пространственная структура в комплексе с кофактором — молекулой PLP. Показано, что замена N174K приводит к образованию основания Шиффа между остатком K174 и PLP подобно тому, как это наблюдается в трансаминазах.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Соглашения № 075-15-2021-1354 от 07.10.2021 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boyko K.M., Matyuta I.O., Nikolaeva A.Y. et al. // Crystals. 2022. V. 12. P. 619. <https://doi.org/10.3390/cryst12050619>
2. Christen P., Mehta P.K. // Chem. Rec. 2001. V. 1. P. 436. <https://doi.org/10.1002/tcr.10005>
3. Bezsudnova E.Y., Popov V.O., Boyko K.M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 2343. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10369-6>
4. Catazaro J., Caprez A., Guru A. et al. // Proteins. 2014. V. 82. P. 2597. <https://doi.org/10.1002/prot.24624>
5. Bezsudnova E.Y., Boyko K.M., Popov V.O. // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. P. 1572. <https://doi.org/10.1134/S0006297917130028>
6. Bezsudnova E.Y., Dibrova D.V., Nikolaeva A.Y. et al. // J. Biotechnol. 2018. V. 271. P. 26. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.02.005>
7. Liang J., Han Q., Tan Y. et al. // Front. Mol. Biosci. 2019. V. 6. P. 4. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00004>
8. Cook P.D., Thoden J.B., Holden H.M. // Protein Sci. 2006. V. 15. P. 2093. <https://doi.org/10.1110/ps.062328306>
9. Evans P.R., Murshudov G.N. // Acta Cryst. D. 2013. V. 69. P. 1204. <https://doi.org/10.1107/S0907444913000061>
10. Vagin A., Teplyakov A. // J. Appl. Cryst. 1997. V. 30. P. 1022. <https://doi.org/10.1107/S0021889897006766>
11. Collaborative Computational Project // Acta Cryst. D. 1994. V. 50. P. 760. <https://doi.org/10.1107/S0907444994003112>
12. Murshudov G.N., Skubak P., Lebedev A.A. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. P. 355. <https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>
13. Emsley P., Cowtan K. // Acta Cryst. D. 2004. V. 60. P. 2126. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>
14. Wallace A.C., Laskowski R.A., Thornton J.M. // Protein Eng. Des. Sel. 1995. V. 8. P. 127. <https://doi.org/10.1093/protein/8.2.127>
15. Dai Y.N., Chi C.B., Zhou K. et al. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 22985. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.480335>

PROTEIN OF UNKNOWN FUNCTION FROM *VARIOVORAX PARADOXUS* WITH AMINO ACID SUBSTITUTION N174K IS ABLE TO FORM SCHIFF BASE WITH PLP MOLECULE

I. O. Ilyasov^a, M. E. Minyaev^b, T. V. Rakitina^c, A. K. Bakunova^a,
V. O. Popov^a, E. Y. Bezsudnova^a, K. M. Boyko^{a,*}

^a*Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^c*National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russia*

*e-mail: kmb@inbi.ras.ru

Abstract. Pyridoxal-5'-phosphate (PLP)-dependent enzymes are one of the most widely represented groups of enzymes in organisms, performing more than 150 different catalytic functions. Based on the three-dimensional structure, members of this group are divided into seven (I-VII) different fold types. Cofactor binding in these enzymes occurs due to the formation of a Schiff base with a conserved lysine residue located in the active site. A recently discovered protein from the bacterium *Variovorax paradoxus* (VAPA), which belongs to the IV fold type and has significant structural similarity to transaminases, contains an asparagine residue at the catalytic lysine position in the transaminases and, as a result, cannot form a Schiff base with PLP and does not have aminotransferase activity. In this research, a point mutant of VAPA protein with the N174K substitution was obtained and its 3D structure was determined. Analysis of the structural data showed that the introduced mutation restores the ability of VAPAN174K to form a Schiff base with a cofactor.