

На правах рукописи

Петренко Дмитрий Евгеньевич

Изучение бактериальной олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* с применением рентгеновских методов

1.5.3. – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Научный руководитель:

кандидат химических наук,
Ракитина Татьяна Владимировна

Официальные оппоненты:

Морозова Елена Андреевна, кандидат химических наук; старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук (Москва)

Лунин Владимир Глебович, доктор биологических наук; заведующий лабораторией биологически активных наноструктур, Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации (Москва)

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

Защита состоится 13 марта 2024 года в 11.00 на заседании диссертационного совета 24.1.037.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН и на сайте www.ibch.ru

Автореферат разослан _____
(дата)

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор физико-математических наук



Олейников В.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Олигопептидазы В (OpB) это трипсиноподобные ферменты, относящиеся к сериновым пептидазам из семейства пролилוליгопептидаз (POP). Все пептидазы семейства POP состоят из двух доменов: С-концевого α/β -гидролазного каталитического домена и N-концевого регуляторного β -пропеллерного домена. Регуляторный домен препятствует проникновению высокомолекулярных субстратов во внутреннюю полость интерфейса между доменами, где находится каталитическая триада. OpB найдены в бактериях и одноклеточных эукариотах (трипаносомах и лейшманиях). Известно, что OpB являются патогенными факторами при паразитарных и некоторых бактериальных инфекциях. При гибели инфекционных агентов OpB попадают в кровь больных и гидролизуют физиологически-важные пептиды, включая предсердный натрийуретический фактор. Также было установлено, что OpB является фактором резистентности к антимикробным пептидам для многих бактерий. В связи с этим, селективные ингибиторы олигопептидаз востребованы в качестве химической основы для создания новых антипаразитарных и антибактериальных препаратов. Моделирование таких ингибиторов *in silico* основано на знании трёхмерной структуры ферментов-мишеней. Пространственные структуры были получены для OpB из *Leishmania major* (LmOpB) и *Trypanosoma brucei* (TbOpB), тогда как структуры бактериальных OpB отсутствовали. При этом сравнение аминокислотных последовательностей ферментов из бактерий и простейших показывало, что из-за аминокислотных замен механизм каталитической активации, предложенный для TbOpB и LmOpB, не может быть автоматически распространён на все бактериальные ферменты. Для выявления структурных детерминант, регулирующих каталитическую активность бактериальных OpB, требовалось установить пространственные структуры бактериальных ферментов.

Цели и задачи

Целью настоящей работы является изучение структурных особенностей бактериальной олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* (PSP) с применением рентгеноструктурных и вычислительных методов.

При выполнении работы были решены следующие задачи:

1. Получение ферментов дикого типа и мутантных производных для структурных исследований, характеристика мутантных производных, получение комплексов с необратимым ингибитором.
2. Подбор условий кристаллизации, получение кристаллов, их рентгеноструктурный анализ, включая сбор и анализ дифракционных данных, решение и уточнение структур.
3. Структурные исследования PSP, её мутантных производных методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) с целью определения конформации фермента в растворе.
4. Сравнительный анализ основных конформаций бактериальных и протозойных OpB с использованием в качестве модельных белков PSP и OpB из *Trypanosoma brucei* (TbOpB). Сравнение способов стабилизации собранной каталитической триады в закрытой конформации ферментов.
5. Биоинформатический анализ последовательностей бактериальных OpB с целью выявления ферментов, сходных с PSP или TbOpB по способу стабилизации собранной каталитической триады, изучение представленности данных групп в бактериальном царстве.

Научная новизна

Установлено, что полиамины способствуют кристаллизации PSP.

Получены и функционально охарактеризованы мутантные варианты PSP: PSPmod, в которой область первого шарнирного пептида заменена на сайт расщепления протеазой

вируса гравировки табака (TEV), и её производные PSPmod-S532A, PSPmod-F75E и PSPmod-E125A, а также мутанты PSP-R151A/E и каталитически неактивный мутант PSP-S532A. Установлено, что модификация шарнирного региона значительно снижает каталитическую эффективность фермента.

Получены комплексы PSP и PSPmod с ковалентным ингибитором Na-p-тозил-лизилхлорметилкетонем (ТСК) и установлено, что модификация шарнирного региона влияет на способ связывания белка и ингибитора.

Получены, депонированы в базу данных PDB, и охарактеризованы первые кристаллические структуры бактериальных ОрВ и их комплексов с ковалентно-связанным ингибитором ТСК в двух разных конформациях: семь структур представляют промежуточную конформацию фермента, мало описанную в литературе, а одна структура представляет фермент в закрытой (каталитически-активной) конформации.

Методом МУРР установлено, что в растворе PSP и PSPmod существуют преимущественно в открытой конформации, а при добавлении спермина фермент стабилизируется в промежуточной конформации. В случае PSPmod в растворе детектируется небольшая фракция промежуточной конформации.

Сравнение структуры ТСК-связанной PSP в закрытой конформации со структурой антипаин (AIP)-связанной TbOrB в закрытой конформации позволило установить, что в PSP и TbOrB стабилизация собранной каталитической триады осуществляется разными способами.

Биоинформатический анализ показал, что по способу стабилизации собранной каталитической триады (PSP- и TbOrB-подобному) все бактериальные ОрВ можно разделить на две основные группы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены первые пространственные структуры ОрВ бактерий в двух разных конформациях, которые могут служить отправными точками для моделирования каталитического цикла бактериальных ОрВ, получения мутантных белков с изменённой активностью и/или поиска специфических ингибиторов фермента, которые могут быть использованы для создания новых антибактериальных препаратов.

Установлено, что путём модификации шарнирного региона можно подавлять каталитическую активность PSP, что в свою очередь указывает на то, что данный регион фермента может служить мишенью для поиска и/или моделирования ингибиторов ОрВ и POP (предположительно пептидной природы), способных оказывать терапевтический эффект при протозойных и бактериальных инфекциях.

Подобрана и успешно опробована эффективная комбинация экспериментальных и вычислительных методов структурной биологии, основанная на использовании структурных данных низкого разрешения, полученных в МУРР экспериментах, как для уточнения конформации белка в растворе, так и для валидации структурных моделей, полученных методами молекулярного моделирования и молекулярной динамики (МД).

Положения, выносимые на защиту

1. Присутствие полиамина спермина в кристаллизационном растворе повышает термостабильность PSP и как следствие способствует кристаллизации.
2. Модификация шарнирной области PSP подавляет каталитическую активность, но способствует кристаллизации фермента.
3. В растворе PSP имеет открытую конформацию, присутствие спермина вызывает сближение доменов без сборки каталитической триады, т.е. образование промежуточной конформации, хорошо поддающейся кристаллизации.
4. Связывание ингибитора ТСК с PSP и PSPmod происходит двумя способами: с

образованием закрытой конформации при связывании одной молекулы ингибитора с PSP и с сохранением промежуточной конформации при связывании двух молекул ингибитора с PSPmod.

5. Способ стабилизации собранной каталитической триады в закрытой конформации PSP отличается от такового в протозойных ферментах TbOpB и LmOpB.
6. По способу стабилизации каталитической триады (PSP- и TbOpB-подобный) бактериальные олигопептидазы B можно разделить на две основные группы.

Личный вклад

Петренко Д.Е. принимал активное участие в планировании и постановке экспериментов, разработке методик, а также в обработке и анализе результатов.

Автором были получены молекулярные модели целевого фермента и изучено их поведение методом молекулярно-динамической симуляции.

Были выявлены функционально-важные заряженные аминокислотные остатки интерфейса между доменами, проведён мутагенез, получены и охарактеризованы мутантные ферменты.

Были подготовлены образцы рекомбинантных белков для рентгеноструктурного анализа.

Автором были найдены условия, способствующие кристаллизации целевого фермента.

Автором были обработаны дифракционные данные, собранные с полученных кристаллов в рентгеноструктурном эксперименте, решены и уточнены пространственные структуры.

Степень достоверности

Достоверность полученных результатов определяется надёжностью применявшихся методов исследования, повторяемостью значений измеряемых параметров в многочисленных экспериментах. Полученные в работе результаты подтверждаются современными исследованиями в данной области.

Апробация результатов

Основные результаты работы докладывались и обсуждались на 11 конференциях и молодежных школах:

44-й конгресс федерации европейских биохимических обществ (the 44th FEBS Congress "From molecules to living systems"), Польша, г. Краков, 2019;

XVI Курчатовская междисциплинарная молодёжная научная школа, Москва, 2019;

IX Российский симпозиум «Белки и пептиды», Сочи-Дагомыс, 2019

63-й Всероссийская научная конференция МФТИ, г. Долгопрудный, 2020;

XXXIII Зимняя молодёжная научная школа ИБХ РАН, Москва, 2021

XXIX Российская конференция по электронной микроскопии. 29-31 августа 2022 года, онлайн.

XXXV Зимняя молодёжная научная школа ИБХ РАН. 8-11 февраля 2022, Москва.

Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology (BGRS/SB-2022), Новосибирск, 04-08 июля 2022 г.

64-я Всероссийская научная конференция МФТИ, 21 ноября - 03 декабря 2021 года, Москва-Долгопрудный-Жуковский

XXXV зимняя молодёжная научная школа ИБХ РАН, 7-10 февраля 2023, Москва

65-ая Всероссийская научная конференция МФТИ 3-8 апреля 2023 года, Москва

Содержание работы отражено в 19 публикациях, в том числе – в восьми опубликованных статьях в рецензируемых научных журналах (WoS, Scopus, РИНЦ) и в 11 тезисах конференций.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 116 страницах и содержит 36 рисунков, 14 таблиц и 242 источника литературы. Структура изложения включает введение, обзор литературы,

материалы и методы, обсуждение результатов, выводы, список сокращений и условных обозначений и список литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обосновывается актуальность исследований, проводимых в рамках данной диссертационной работы, формулируется цель, ставятся задачи работы, раскрыты научная новизна и практическая значимость представляемой работы.

В первой главе приводится обзор научной литературы по изучаемой проблеме. Представлен анализ семейства POP и его подсемейств. Проанализированы работы по структурным исследованиям POP, включая исследования протозойных OpV и бактериальных пролилэндопептидаз (PER).

Вторая глава посвящена описанию методов, используемых в работе. Описано получение рекомбинантных олигопептидаз и анализ их каталитической активности, проведение мутагенеза, подбор условий кристаллизации, решение и уточнение пространственных структур, а также эксперименты по моделированию белков и комплексов и эксперименты по молекулярно-динамической симуляции.

В третьей главе описываются результаты теоретических и экспериментальных исследований PSP.

Раздел 3.1 посвящен структурным исследованиям PSP, её мутантов и комплексов с ингибитором рентгеновскими методами и сравнительному анализу полученных структур.

Кристаллизацию PSP, её мутантов и комплексов проводили на базе ресурсного центра молекулярной и клеточной биологии НИЦ «Курчатовский институт». При проведении кристаллизационных экспериментов использовали белки PSP - рекомбинантный белок дикого типа, содержащий N-концевой полигистидиновый таг, PSPmod - мутантную PSP, в которой первый шарнирный пептид заменён на сайт расщепления протеазой TEV, каталитически неактивные мутанты PSP и PSPmod, в которых каталитический серин замещён остатком аланина: PSP-S532A и PSPmod-S532A, а также PSP и PSPmod, несущие активирующую мутацию E125A (PSP-E125A и PSPmod-E125A). Для получения комплексов использовали белки PSP и PSPmod и известный ковалентный ингибитор сериновых и цистеиновых протеаз TCK.

Так как первоначальный кристаллизационный скрининг не выявил условий кристаллизации белка, то был проведен поиск условий, способствующих кристаллизации PSP, методом дифференциальной сканирующей флуориметрии (ДСФ).

3.1.1. Поиск условий, способствующих кристаллизации PSP, методом дифференциальной сканирующей флуориметрии.

Чтобы найти условия, способствующие стабилизации и, соответственно, кристаллизации PSP использовали метод ДСФ. Данный метод позволяет быстро анализировать стабильность белков в растворах разного состава. Он основан на добавлении в водный раствор белка термостабильных флуоресцентных красителей, способных неспецифически связываться с гидрофобной поверхностью белка. При постепенном повышении температуры тепловая денатурация белка приводит к разворачиванию гидрофобного ядра, которое становится доступным молекулам красителя. При связывании красителя с гидрофобным ядром гашение флуоресценции молекулами воды снимается, и квантовый выход флуоресценции резко возрастает, что определяется РВ-амплификатором. Полученная кривая тепловой денатурации позволяет рассчитать температуру плавления белковой глобулы, являющуюся одним из показателей стабильности белка. Сдвиг температуры плавления при различных значениях рН, ионной силы, вязкости или в присутствии каких-либо добавок позволяет найти факторы, способствующие стабилизации белковой глобулы. Увеличение стабильности белка способствует повышению результативности структурных исследований методом РСА.

Согласно результатам ДСФ температура плавления ($T_{пл}$) PSP была около 40°C , а в присутствии низкомолекулярных полиаминов, к которым относятся спермин, спермидин, цистамин и кадаверин, $T_{пл}$ поднималась более чем на 2°C . Поэтому дальнейшую кристаллизацию PSP, её мутантов и комплексов проводили в присутствии полиамина – спермина (Sp).

Наибольшее число кристаллических структур было получено для фермента PSPmod, в котором был модифицирован шарнирный пептид, соединяющий два домена (таблица 1). Одна структура была получена для PSPmod в комплексе с ТСК. Только две кристаллические структуры были получены для PSP с интактным шарнирным пептидом. Из них одна структура была получена для PSP в комплексе с ТСК, а вторая для PSP-S532A в свободной форме.

Таблица 1. Пространственные структуры PSP и её производных, установленные в данной работе

Белок	PSPmod	PSPmodE125A	PSPmodS532A	PSP-S532A	PSPmod	PSPmod	PSPmod-TCK	PSP-TCK
PDB_ID	7OB1	7NE4	7NE5	7ZJZ	7YWS	7YX7	7NE7	7YWP
Разрешение	2.00	2.72	1.88	1.9	1.7	1.72	2.3	2.2

3.1.2 Характеристика мутантных вариантов PSP, используемых в рентгеноструктурных экспериментах.

Как уже было сказано выше, для рентгеноструктурных экспериментов использовали препараты PSP дикого типа и мутантные варианты.

В частности, был получен мутант, в котором последовательность первого шарнирного пептида (аминокислоты 71-77, IPQQEHS) была заменена на последовательность, содержащую TEV-сайт (ENLYFQ*S) (рисунок 1).

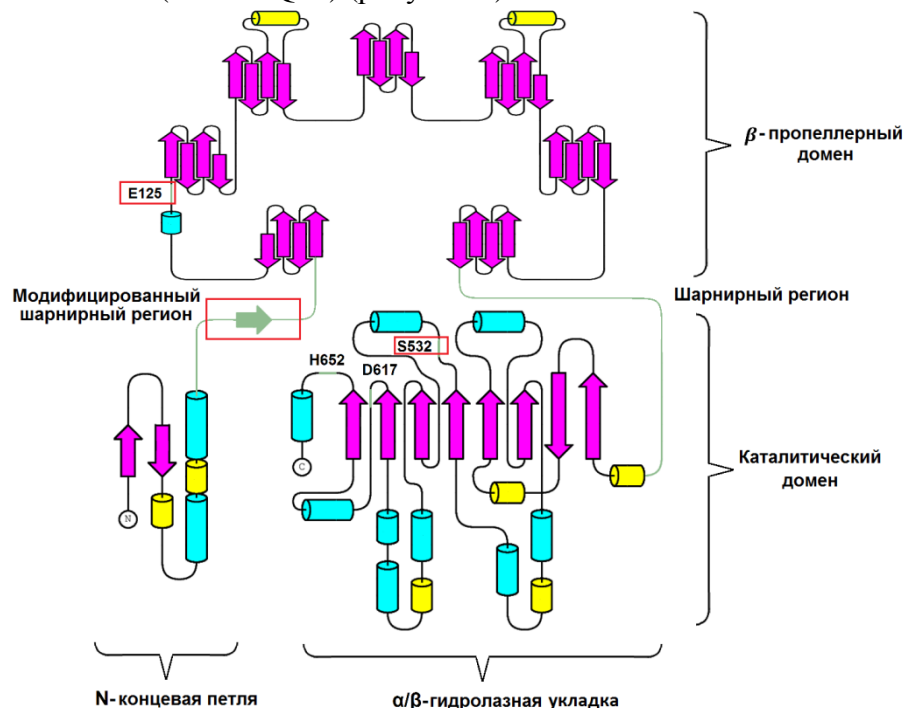


Рисунок 1 Топологическая схема вторичной и третичной структуры OrV, подготовленная с использованием кристаллической структуры PSPmod. В каталитическом и β -пропеллерном доменах области петель показаны черным цветом, α -спирали - голубым, β -нити - фиолетовым и 3_{10} -спирали - желтым цветом. Шарнирные области между двумя доменами и остатки каталитической триады показаны бледно-зеленым цветом. Нумерация остатков каталитической триады соответствует последовательности PSP. Модифицированные остатки отмечены красным квадратом.

Полученный мутантный белок с модифицированной шарнирной областью (PSPmod) экспрессировали в *E. coli* и очищали до гомогенности. Сайт распознавания TEV был

подтвержден масс-спектрометрией Maldi-TOF, однако TEV-протеаза не гидролизовала белок. Предположительно это было связано с сильным взаимодействием шарнирных пептидов между собой и с соседними участками белка.

Так как первые кристаллы были получены именно для PSPmod и её производных, несущих дополнительные точечные замены, то был проведён сравнительный анализ физико-химических свойств и ферментативной активности данных ферментов (рисунок 2).

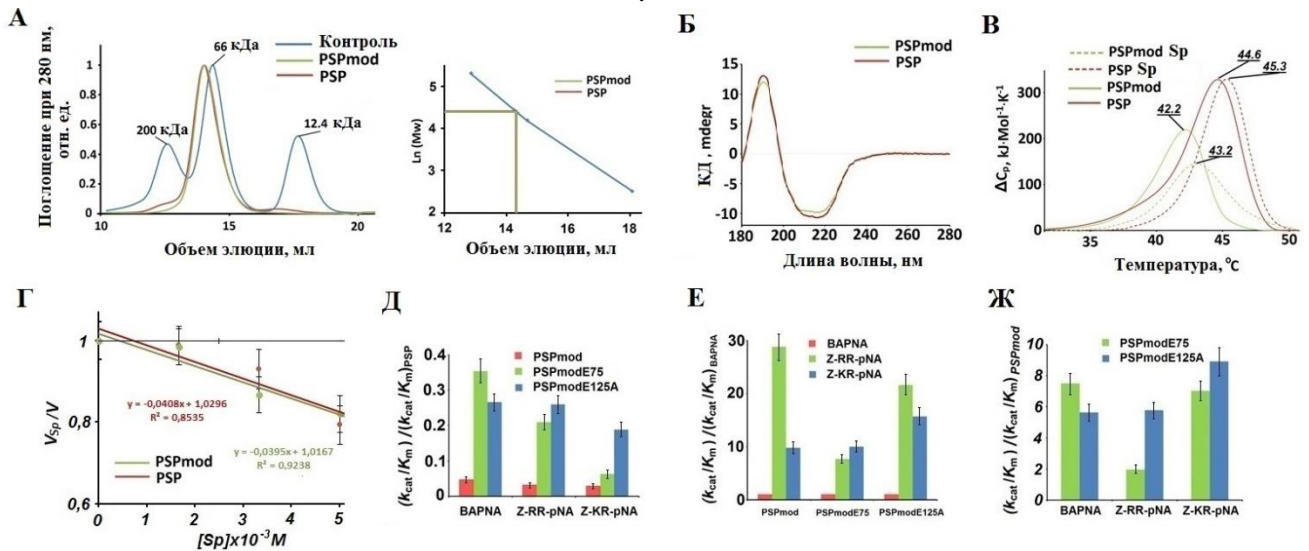


Рисунок 2. Сравнительный анализ физико-химических свойств и ферментативной активности PSPmod. **А.** Гистограмма гель-фильтрационной хроматографии (ГФХ) на колонке Superdex 200 10/300 GL; **Б.** Спектры КД, нормированные на значение оптической плотности (0,5 при 205 нм); **В.** Температурная зависимость избыточной теплоемкости денатурации (ΔC_p), измеренная методом ДСК для PSP и PSPmod в присутствии и в отсутствии спермина. Температуры максимумов кривых плавления (T_{max}) показаны в верхней части пиков; **Г.** Влияние спермина на начальные скорости гидролиза PSP и PSPmod субстрата BAPNA. **Д – Ж.** Кинетические параметры гидролиза (k_{cat}/K_m), нормированные, как указано в легенде по оси Y. Соответствующие параметры для PSP дикого типа (**Д**) и PSPmod (**Ж**) по отношению к указанным субстратам равны единице и не показаны

По данным ГФХ оба белка являются мономерами с молекулярной массой 80 кДа (расчетная молекулярная масса составляет 76 кДа) (рисунок 2А). Аналогично, спектры КД PSP и PSPmod были близки друг к другу (рисунок 2Б).

Тепловую денатурацию PSP и PSPmod изучали методом ДСК при концентрации белка 2,0 мг/мл в 25 мМ натрий-фосфатном буфере pH 7,8. Из рисунка 2В видно, что положения максимумов кривых плавления (T_{max}) PSPmod и PSP отличаются незначительно (на 2 °С).

Так как все кристаллизационные эксперименты проводили в присутствии полиамина Sp, было изучено влияние Sp на тепловую денатурацию и каталитическую активность PSP и PSPmod. Эксперимент показал, что Sp вызывает увеличение T_{max} на два градуса для обоих белков (рисунок 2В). Влияние Sp на каталитическую активность как PSP, так и PSPmod также было одинаковым: 5 мМ Sp уменьшали начальную скорость гидролиза на 20% (рисунок 2Г).

Параллельно была измерена ферментативная активность PSPmod в отношении трёх р-нитроанилидных (pNA) субстратов: BAPNA (р-нитроанилид N α -бензоил-DL-аргинина; субстрат без остатка в P2-положении, взаимодействующий только с сайтом связывания субстрата S1) и субстраты Z-(R/K)R-pNA, с разными основными остатками в положении P2. Сравнение эффективности гидролиза (k_{cat}/K_m) мутантных белков с эффективностью гидролиза PSP дикого типа представлено на рисунке 2Д-Ж.

Активность PSPmod по отношению ко всем субстратам составляет от 3 до 5% от активности PSP (рисунок 2Д). При этом такие характеристики субстратной

специфичности PSP, как повышенная активность по отношению к двухосновным субстратам или предпочтение остатка R в положении P2, сохраняются (рисунок 2Е).

Мы попробовали найти причину потери активности PSPmod. В PSPmod присутствовала мутация функционально важного остатка E75 (E75F); мутация E75A вызывала падение активности PSP дикого типа по отношению к трем нитроанилидным субстратам на 82-92%. Восстановление E75 в PSPmod с помощью сайт-специфического мутагенеза увеличило эффективность гидролиза PSPmodE75 в отношении BAPNA, Z-RR-pNA и Z-KR-pNA по сравнению с PSPmod примерно в 7, 2 и 7 раз (рисунок 2Ж), что соответствует восстановлению активности по отношению к соответствующим субстратам до 35, 21 и 6% от активности PSP (рисунок 2Д).

Частичное восстановление каталитической активности PSPmod также наблюдалось после замены на аланин остатка E125 из β -пропеллерного домена. Эффективность гидролиза по отношению к трём субстратам PSPmodE125A составляла от 19 до 26% от аналогичных показателей для PSP (рисунок 2Д), что соответствовало увеличению эффективности гидролиза (k_{cat}/K_m) по сравнению с PSPmod примерно в 6-9 раз (рисунок 2Ж). Ранее было установлено, что мутация E125A увеличивала активность PSP по отношению к BAPNA и двухосновным субстратам примерно в 8 и 2 раза.

3.1.3. Сравнение кристаллических структур PSPmod и её производных между собой и со структурой PSP-S532A.

Первоначально с использованием источника синхротронного излучения НИЦ «Курчатовский Институт» были собраны дифракционные наборы, с использованием которых были установлены пространственные структуры PSPmod (PDB_ID 7OB1) и её производных, PSPmodE125A (PDB_ID 7NE4) и PSPmodS532A (PDB_ID 7NE5) при разрешении 2, 2,72 и 1,88 Å, соответственно. Наложение структур 7NE4 и 7NE5 по Ca -атомам на структуру 7OB1 показало практическую идентичность укладки PSPmodE125A и PSPmodS532A по сравнению с PSPmod (СКО 0,9 и 0,6 Å) (рисунок 3А).

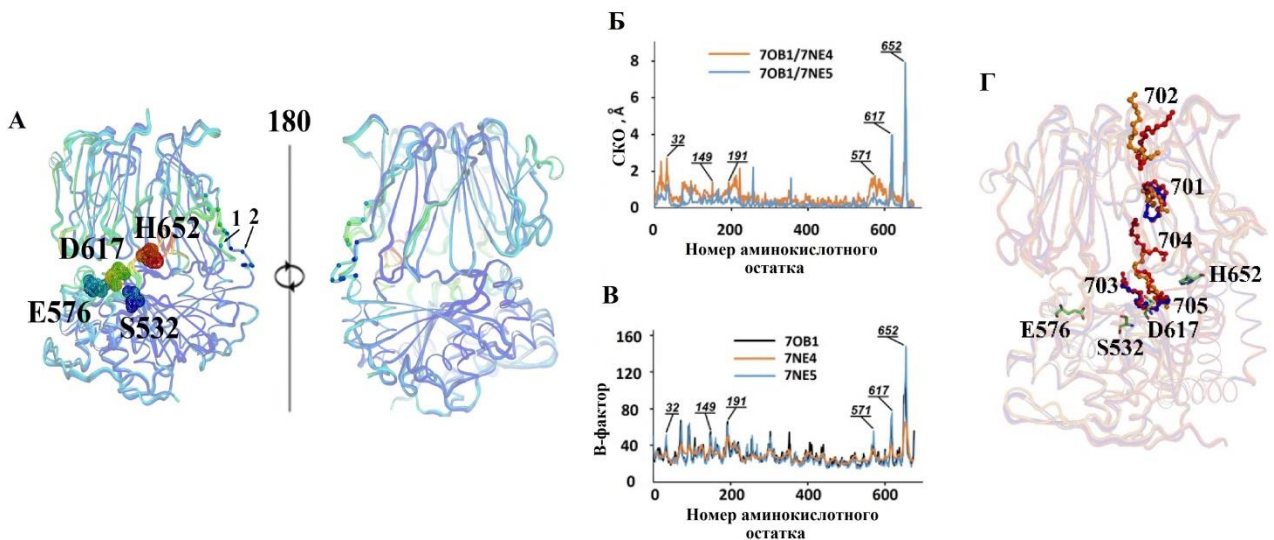


Рисунок 3. Сравнение структур PSPmod (PDB_ID 7OB1), PSPmodE125A (PDB_ID 7NE4) PSPmodS532A (PDB_ID 7NE5). **А.** Показано наложение структур в двух проекциях. Структуры окрашены в соответствии с B-факторами. Изменение цвета от синего к красному соответствует росту величины B-фактора от низкого до высокого. Выделены остатки каталитической триады и субстрат-связывающего центра S1 PSPmod. Шарнирные пептиды пронумерованы, а их остатки показаны в виде шариков. **Б.** Распределение величин СКО по Ca атомам, рассчитанное при попарном совмещении структуры PSPmod со структурами PSPmodE125A и PSPmodS532A. **В.** Распределение величин B-фактора для трех кристаллических структур. Остатки с самыми высокими значениями СКО и B-фактора подписаны на (**Б**, **В**). **Г.** Расположение молекул спермина в структурах PSPmod (красный цвет), PSPmodE125A (оранжевый) и PSPmodS532A (синий). Молекулы спермина показаны шариками и палочками и пронумерованы в

соответствии со структурой PSPmod. Остатки каталитической триады и субстрат-связывающего центра S1 PSPmod показаны в виде зеленых палочек.

Среднеквадратичные отклонения по $\text{C}\alpha$ -атомам, полученные при наложении структур, представлены на рисунке 3Б. Хорошо видно, что вариации укладки наблюдаются в основном в гибких петлях β -пропеллерных и каталитических доменов, имеющих высокие В-факторы (рисунок 3В). Все структуры содержали разное количество молекул спермина во внутренней полости между доменами и в центральном туннеле β -пропеллера, а именно, пять, три и две молекулы спермина в структурах PSPmod, PSPmodE125A и PSPmodS532A (рисунок 3Г).

Следующий рентгеноструктурный эксперимент проводили на источнике синхротронного излучения SPring8 (Япония). В результате были получены дифракционные наборы для ещё двух кристаллов PSPmod (PDB_ID 7YWS и 7YX7) и кристалла PSP-S532A (PDB_ID 7ZJZ). Структуры были решены методом молекулярного замещения и уточнены до разрешения 1,9 Å (PSP-S532A 7ZJZ), 1,7 (PSPmod 7YWS) и 1,72 Å (PSPmod 7YX7). Все три структуры были очень похожи между собой, а также похожи на ранее полученные структуры. Наложение структуры PSP-S532A по $\text{C}\alpha$ -атомам на структуры PSPmod 7YWS и 7YX7 показало СКО 0,4 Å (рисунок 4). Наложение двух структур PSPmod друг на друга дало СКО 0,3 Å. Аналогичные значения СКО были получены при наложении новых структур на ранее описанную структуру PSPmod (PDB_ID 7OB1).

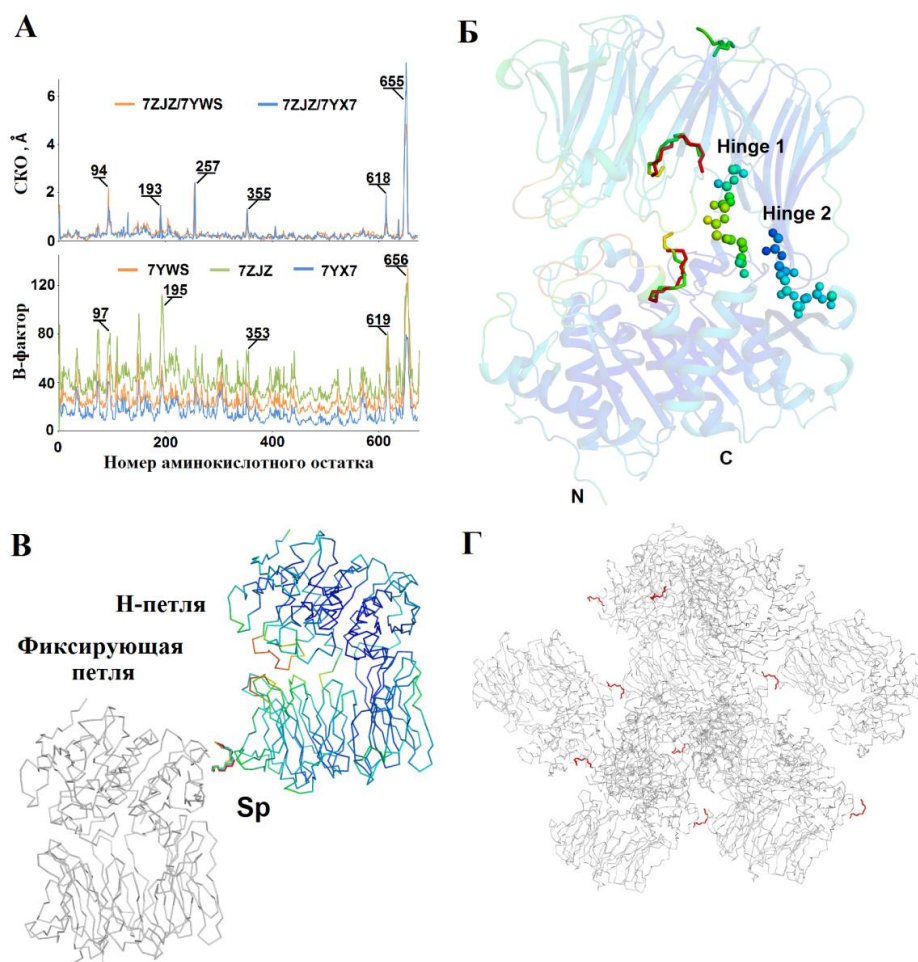


Рисунок 4. Сравнение структур PSPmod (PDB_ID 7YWS и 7YX7) и PSP-S532A (PDB_ID 7ZJZ). **А.** Распределение величин СКО по $\text{C}\alpha$ атомам, рассчитанное при попарном совмещении структуры PSP-S532A со структурами PSPmod 7YWS и 7YX7 (верх), и распределение величин В-фактора для трех кристаллических структур (низ). Остатки с самыми высокими значениями СКО и В-фактора подписаны. **Б.** Структура PSP-S532A со сперминами в междоменной полости, окрашенная в соответствии с В-факторами.

Изменение цвета от синего к красному соответствует росту величины В-фактора от низкого до высокого. Шарнирные пептиды пронумерованы, а их остатки показаны в виде шариков. Красным цветом показаны две молекулы спермина из структуры PSPmod 7YWS. В. Консервативные молекулы спермина, локализованные вне междоменного пространства, соединяющие каталитический домен одного полипептида (серый цвет) с β -пропеллерным доменом другого полипептида (окраска по В-фактору) во всех трёх структурах, окрашены в зелёный, красный и оранжевый цвета. Г. Участие спермина (красный) в формировании кристаллической решетки.

На рисунке 4А показаны результаты наложения структур. Видно, что различия между ними сосредоточены в неструктурированных петлях (остатки которых имеют высокие В-факторы), соединяющих стабильные элементы вторичной структуры в обоих доменах. Таким образом, можно было заключить, что изменения шарнирного региона не оказывает сильного влияния на общую топологию молекулы. Молекулы спермина локализованы в полости между каталитическим и β -пропеллерным доменами только в структурах PSP-S532A и PSPmod (7YWS) (рисунок 4Б). В междоменном пространстве структуры PSPmod (7YX7) спермин обнаружен не был. Во всех структурах одна молекула спермина на молекулу белка была обнаружена вне междоменной полости, где она участвовала в формировании кристаллической решетки (рисунок 4В, Г).

3.1.4 Общая топология белка в кристаллических структурах PSPmod и PSP-S532A.

Полипептидная цепь рекомбинантной PSP состоит из 685 аминокислотных остатков, включая девять остатков N-концевого His-тага (MASHNNNNH), который, как правило, отсутствует на электронной плотности, за исключением последнего H из His-тага в некоторых структурах. Как уже было сказано выше, во всех полученных структурах полипептидные цепи были уложены аналогичным образом, образуя двухдоменную укладку, сходную с укладкой протозойных OpB (рисунок 1).

Молекула PSP содержит каталитический домен, который в свою очередь состоит из N-концевой петли (остатки 1–70), C-концевого α/β -гидролазного домена (остатки 411–676) и семилопастной β -пропеллер (остатки 77–404), в котором первая и последняя лопасти не перекрываются (рисунок 5). α/β -гидролазная укладка содержит центральное ядро из скрученного β -слоя, состоящего из восьми β -тяжей, окруженных восемью α -спиралями и семью короткими η -спиралями (рисунок 5А (левая панель)). Только два последних β -тяжа скрученного листа антипараллельны, тогда как остальные имеют параллельную ориентацию. N-концевая петля состоит из двухцепочечного антипараллельного β -слоя и двух α -спиралей с одной короткой η -спиралью между ними. Петля оборачивается вокруг поверхности α/β -гидролазного домена, примыкая к длинной C-концевой α -спирали. Поверхности каталитического и пропеллерного доменов, обращенные друг к другу, ограничивают междоменную полость, где располагаются каталитический и субстрат-связывающие сайты (рисунок 5А). β -пропеллерный домен построен из семи лопастей, каждая из которых состоит из четырех антипараллельных β -тяжей (рисунок 5А (правая панель)). Эти лопасти образуют бочку с воронкообразным каналом внутри, который проходит между лопастями пропеллера (рисунок 5Б). Периметр канала ограничен аминокислотными остатками гибких петель, соединяющих пары β -тяжей (рисунок 5Б). Помимо канала в β -пропеллере доступ раствора, малых молекул и пептидов в междоменную полость возможен через полость между гибкими петлями β -пропеллера и каталитического домена, расположенными по периметру междоменной полости (рисунок 5В). Диаметр данной полости может заметно варьировать в связи с высокой подвижностью окружающих её петель, на которую указывает высокая величина В-фактора (рисунок 4А).

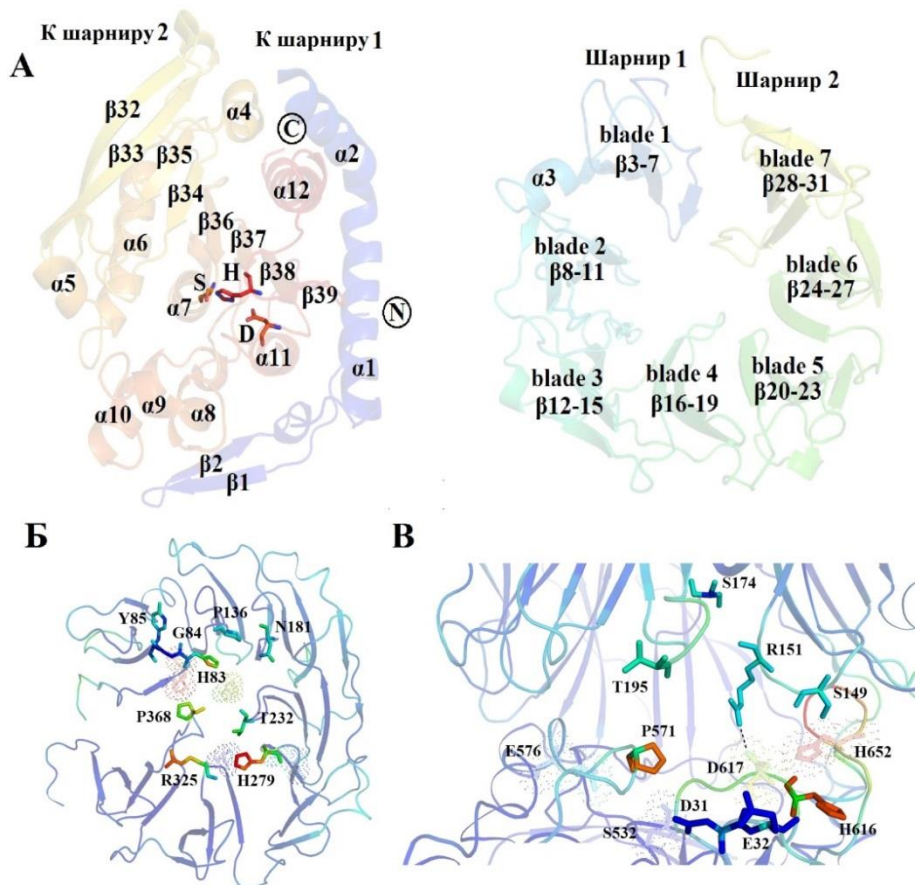


Рисунок 5. А. Полупрозрачные изображения структур двух доменов PSP: каталитический домен (слева), пропеллерный (справа). Вид изнутри междоменной полости. Цветовая кодировка выполнена в радужном стиле: N-конец выделен синим цветом, а С-конец красным. Подписаны элементы вторичной структуры и два шарнирных пептида. Каталитический домен включает N-концевую петлю (синяя окраска) и α/β -гидролазную укладку (окраска от желтого к красному). Остатки каталитической триады показаны палочками и подписаны. Б. Отверстия в β -пропеллерном домене и на границе между доменами. Изображение входа в канал, который соединяет верхнюю часть β -пропеллерного домена с полостью между доменами, и аминокислотные остатки, ограничивающие периметр канала. Изменение цвета с синего на красный отражает сдвиг В-факторов от низкого к высокому. В. Аналогичное представление отверстия в междоменном интерфейсе и аминокислотных остатков, ограничивающих вход в отверстие. Остатки каталитической триады и центр связывания субстрата S1 представлены полупрозрачными пунктирными изображениями. Пунктирная линия показывает взаимодействие между R151 и каталитическим D617.

Наибольшую подвижность имеет N-петля каталитического домена (остатки 649–658), несущая каталитический H652. Данная петля не полностью локализована на электронной плотности. Со стороны β -пропеллера повышенную гибкость имеет петля, включающая остатки 192–196 (рисунок 6А). В PEP эта петля была названа фиксирующей петлей из-за ее способности перекрывать вход в полость между доменами и таким образом участвовать в селекции субстрата. В отличие от PEP, в OrP эта петля заметно укорочена, и из-за этого она не способна самостоятельно регулировать доступ в междоменное пространство через отверстие в интерфейсе между доменами.

Два шарнирных пептида (№1 и №2) соединяют N-концевую петлю с пропеллерным доменом и пропеллерный домен с α/β -гидролазным доменом. В PSPmod оригинальная последовательность шарнирного пептида #1 заменена на сайт протеазы TEV. Высокое значение В-фактора говорит о подвижности этой области по сравнению со вторым шарнирным пептидом как в структурах PSPmod, так и в структуре PSP-S532A (рисунок 4В и 5А). Сравнение исходного шарнирного пептида (IPQQEH) в структуре PSP-S532A и модифицированного (ENLYFQ) в структуре PSPmod (7YWS) показано на рисунке 6.

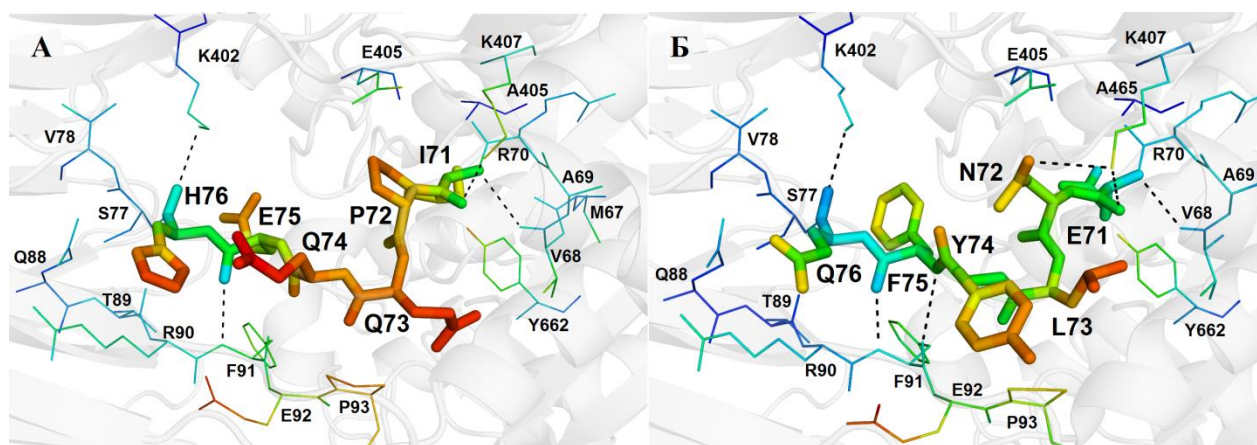


Рисунок 6. Сравнение интактной и модифицированной шарнирных областей в структурах PSP-S532A (PDB ID 7ZJZ) и PSPmod (PDB 7YWS). **А.** Аминокислотное окружение в радиусе 4 Å и полярные контакты (пунктирные линии) интактного шарнирного пептида №1. **Б.** Аналогичное представление модифицированного шарнирного пептида №1. Все остатки показаны в палочках и окрашены в соответствии со значениями B-фактора. Остатки первого шарнирного пептида увеличены.

Интактный и модифицированный пептиды имеют сходный состав алифатических, заряженных и полярных остатков, но другой порядок распределения зарядов. В обоих случаях (независимо от модификации) основные цепи шарнирных пептидов стабилизированы за счет полярных контактов с прилегающими участками каталитического и β -пропеллерного доменов, а также со вторым шарнирным пептидом, включающими водородные связи I/E71N-V68O, E/F75O-F91N, H/Q76O-K402NZ, I/E71O-K407NZ. Кроме того, F75 из модифицированного шарнира взаимодействует с F91 как через основные цепи (F75N-F91O), так и через фенольные кольца боковых цепей (стекинг взаимодействие). Остатки L73 и Y74 из модифицированного шарнира стабилизированы гидрофобными взаимодействиями с остатками P93 и Y662. Эти дополнительные взаимодействия снижают подвижность модифицированного шарнира по сравнению с интактным и это, казалось бы, небольшое уменьшение локальной подвижности отражается на поведении всей молекулы, так как мы видим значительное снижение каталитической активности PSPmod по сравнению с PSP.

3.1.5. Каталитическая триада в кристаллических структурах PSPmod и PSP-S532A

Каталитическая триада PSP, которая создает систему ретрансляции заряда для нуклеофильной атаки каталитического S во время гидролиза, состоит из аминокислотных остатков S532, D617, H652 (рисунок 7). S532 расположен в центре междоменной полости, на короткой петле между нитью β 36 и спиралью α 7; его боковая цепь обращена к пропеллерному домену. Во всех структурах PSPmod и в структуре PSP-S532A остатки S532 или A532 одинаково стабилизированы многочисленными контактами своих основных цепей с остатками из ближайшего окружения. D617 расположен ближе к поверхности фермента на гибкой петле (остатки 615–623) между нитью β 38 и α 11-спиралью. Как видно из рисунка 8, в структурах PSP-S532A и PSPmod каталитические остатки D617 и петли, на которых они расположены, имеют разную степень подвижности. В структуре PSPmod (PDB ID 7OB1) положение каталитического D617 стабилизировано за счет взаимодействия его боковой цепи с боковой цепью R151 из β -пропеллерного домена (расстояния D617OD1/2-R151NH1/2 составляют 3–3,2 Å). Образующийся солевой мостик блокирует вход в междоменную полость через вышеописанное отверстие в интерфейсе между доменами (рисунок 5B). В структуре PSP-S532A боковые цепи R151 и D617 направлены в противоположные стороны, в результате чего боковая цепь D617

взаимодействует с основной цепью соседнего S618 (расстояния D617OD1–S618N составляет 3,05 Å). В отсутствие фиксирующего солевого мостика вся петля, несущая D617 (D-петля), становится более подвижной (B-факторы остатков увеличены), что, видимо, способствует эффективной каталитической активации PSP, так как фиксация D617 вследствие формирования солевого мостика с R151 ассоциирована со значительным снижением каталитической активности PSPmod.

Третий остаток каталитической триады, H652, расположен на очень гибкой и длинной N-петле (остатки 648–658) между цепью β 39 и C-концевой спиралью α 12. Как уже было отмечено выше, эта петля не полностью локализована на карте электронной плотности.

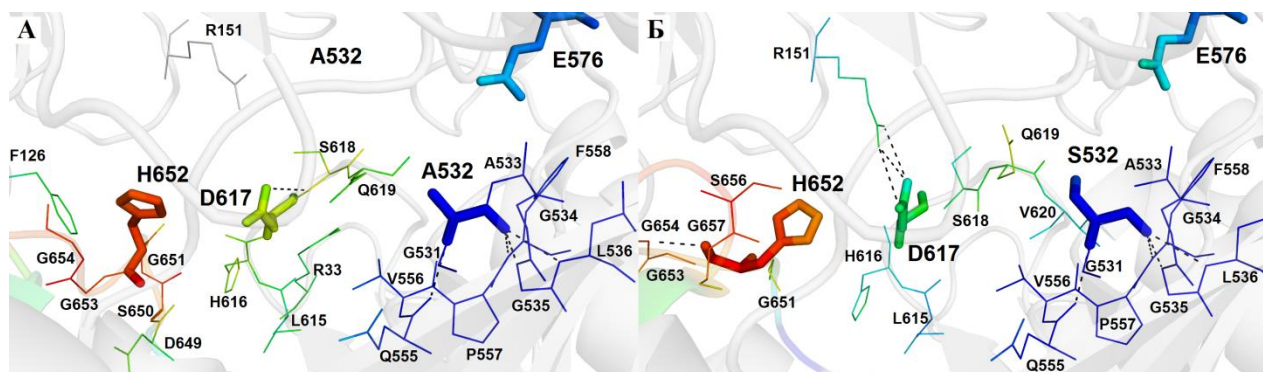


Рисунок 7. Аминокислотное окружение каталитической триады в радиусе 4 Å в структурах PSP-S532A (А) и PSPmod (7YWS) (Б). Все остатки окрашены в соответствии со значениями B-фактора. Остатки E576 субстрат-связывающего центра S1 и остатки каталитической триады увеличены. Полярные контакты показаны пунктирными линиями.

3.1.6. Конформация белка в кристаллических структурах PSPmod и PSP-S532A

В литературе описаны три конформации, характерные для ферментов из семейства POP, обнаруженные методом PCA. В закрытой (каталитически активной) конформации домены и остатки каталитической триады располагаются близко друг к другу, что позволяет протекать катализу. В открытой (неактивной) конформации происходит разделение доменов и остатков каталитической триады, что препятствует катализу, но облегчает поступление субстрата в активный центр, расположенный в междоменной полости. Промежуточная конформация сочетает в себе нарушенную каталитическую триаду открытой конформации с замыканием доменов, напоминающим закрытую конформацию.

Для того чтобы количественно охарактеризовать степень собранности/разобщённости каталитической триады и близости/отдаленности доменов, из базы данных PDB были отобраны структуры, полученные для разных конформаций ферментов TbOpV и PEP из *Aeromonas punctate* (ApPEP), *Galerina marginata* (GmPEP) и *Pyrococcus furiosus* (PfPEP), и проведён их анализ по следующим параметрам: расстояния между остатками каталитической триады и расстояния между центрами масс доменов, а также процент поверхности междоменного интерфейса от общей поверхности белка, процент остатков в междоменном интерфейсе и количество междоменных контактов (таблица 2).

Таблица 2. Каталитическая триада и расположение доменов в кристаллической структуре PSPmod и структурах TbOpV, ApPEP и PfPEP, закристиализованных в разных конформациях.

PDB_ID	7OB1	4BP8	4BP9	3IUL	3IVM	5T88
Конформация	промежуточная	открытая	закрытая	открытая	закрытая	промежуточная

белок	PSPmod	TbOpB	ApPEP	PfPEP		
Остатков в кристаллической структуре*	677	712	710	669	682	618
Выровненных остатков*	677	668	665	605	650	600
Z-оценка *	61.8	44.0	46.3	42.5	41.1	37.8
Совпадение, %*	100	37	38	27	27	22
СКО, Å*	0	3.8	2.2	4.5	2.8	3.0
Расстояние кат. S-H C α , Å	18.2	18.5	8.3	Н/Д **	8.3	23.6
Расстояние кат. S-OG H-NE2, Å	13.9	18.3	3.5	Н/Д **	3.3	17.4
Расстояние кат. D-H C α , Å	10.6	7.6	4.5	Н/Д **	4.5	10.9
Расстояние кат. D-OD2 H-ND1, Å	9.0	11.8	3.1	Н/Д **	2.9	7.0
Расстояние между центрами масс доменов, Å	32.3	36.7	30.4	38.7	30.7	30.9
Площадь поверхности интерфейса, кат./проп. домен, % ¹	11.3/9.4	8.4/7.5	14.0/12.3	8.1/7.7	16.9/14.6	12.2/11.5
Остатки интерфейса, кат./проп. домен, % ²	16.3/15.9	10.3/10.5	17.4/16.9	12.1/7.7	22.4/19.5	18.5/15.1
$\Delta^i G$, ккал/м	-12.9	-8.9	-17.8	-20.8	-23.6	-23
Водородные связи	11	14	28	7	22	16
Солевые мосты	4	4	4	-	2	1

* - по структурному анализу Dali ** - недоступно из-за плохой электронной плотности в области His-петли; *** - отсутствует в связи с заменой каталитического S на A;¹ - доля поверхности интерфейса в процентах от общей площади домена;² - доля остатков в интерфейсе от общего количества остатков в домене.

В структуре PSPmod (7OB1) расстояния между C α -атомами в парах S532–H652 и H652–D617 равны 18,2 и 10,6 Å, соответственно (таблица 2). Это больше, чем в закрытых конформациях TbOpB и ApPEP, и сравнимо с открытой конформацией TbOpB и промежуточными конформациями PfPEP и GmPEP (таблица 2), что указывает на разобщённую конфигурацию каталитической триады. Аналогичные расстояния наблюдаются в остальных структурах PSPmod, а также в структурах производных PSPmod (PSPmodE125A, PSPmodS532A) и в структуре PSP-S532A. В то же время взаимное расположение доменов друг относительно друга во всех полученных структурах сходно с таковым в структурах ферментов, закристилизованных в закрытой и промежуточной

конформации (таблица 2). Таким образом было установлено, что PSPmod и её производные, а также PSP-S532A, были закристаллизованы в промежуточной конформации, для которой характерно сближение доменов без сборки каталитической триады (рисунок 8).

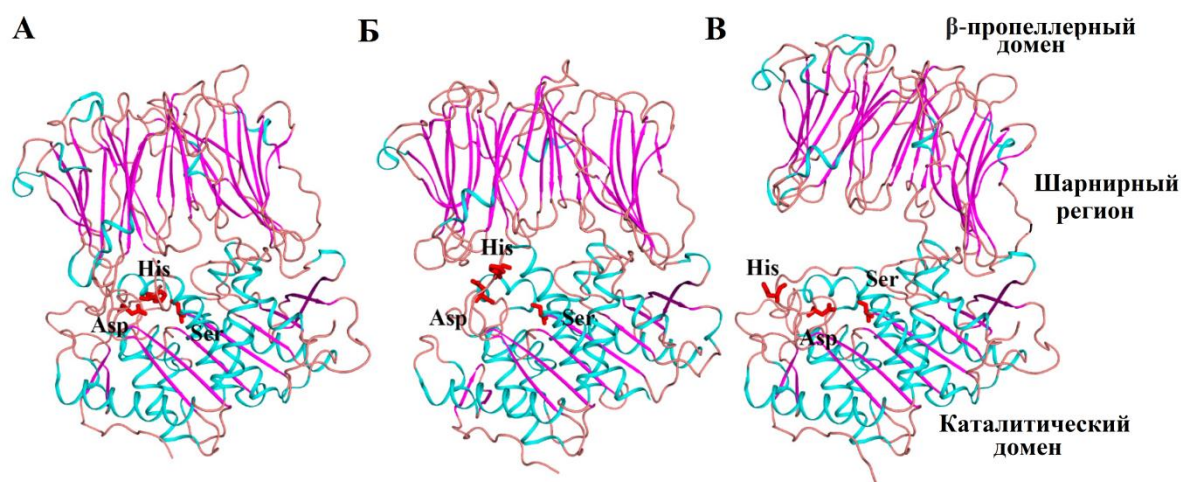


Рисунок 8. Расположение доменов и каталитической триады в закрытом (А), промежуточном (Б) и открытом (В) конформационных состояниях OrP.

Во всех случаях в структурах ферментов семейства POP в промежуточных конформациях были обнаружены субстратоподобные соединения или субстраты (в случае мутированного GmPEP), локализованные в междоменных полостях: пролилпролиновые лиганды в PfPEP и молекулы спермина в PSPmod. По-видимому, попадание лигандов в междоменную полость стимулирует сближение доменов, однако без связывания субстрата сборка каталитической триады и каталитическая активация фермента не происходит.

Принимая во внимание присутствие полиаминов и других субстратоподобных молекул в бактериальных (или архейных) клетках, конформационный переход, индуцированный спермином или пролилпролином (в случае PfPEP), может повторять естественную стадию функционирования фермента. Двухстадийная каталитическая активация, представляющая собой переход от открытой конформации к закрытой через промежуточную конформацию, в которой закрытие домена предшествует формированию рабочей конфигурации каталитической триады, может быть широко распространена *in vivo*.

3.1.7 Сравнительный анализ кристаллических структур PSP и PSPmod в комплексе с ингибитором Na-p-тозил-лизилхлорметилкетонем.

Для получения комплексов использовали ковалентный ингибитор сериновых и цистеиновых протеаз ТСК и белки PSP и PSPmod. Активность ингибиторов в отношении соответствующих белков была охарактеризована. В случае PSP кинетические параметры ингибирования соответствовали уравнению Михаэлиса-Ментон, что указывало на связывание одной молекулы ингибитора с молекулой белка. В случае PSPmod, зависимость обратной величины константы скорости псевдопервого порядка (k') от обратной величиной концентрации ингибитора не была линейной, и была рассмотрена возможность связывания двух молекул ингибитора (рисунок 9А).

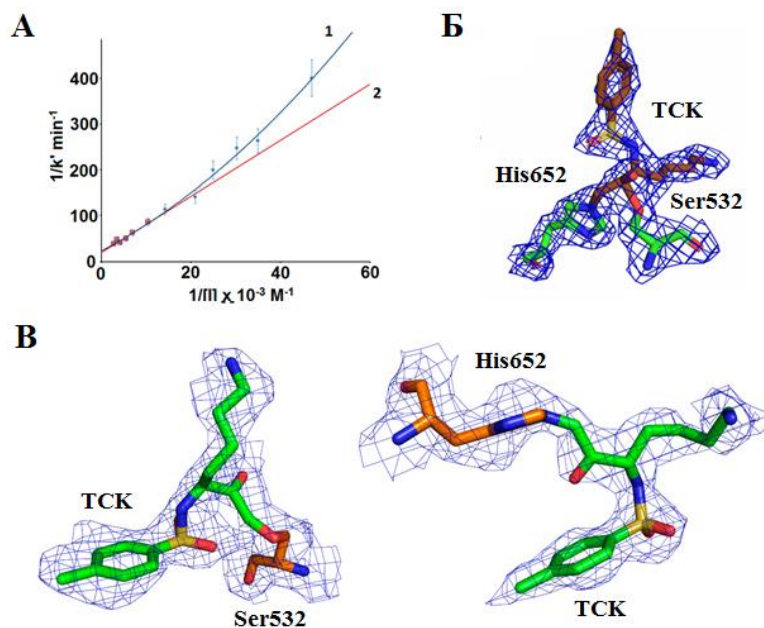


Рисунок 9. Модификация шарнирного региона влияет на связывание ТСК с PSP. **А.** Ингибирование PSPmod (1,25 мкМ) ТСК в диапазоне концентраций 21–352 мкМ (1) и 100–352 мкМ (2). **Б.** Карта электронной плотности молекулы ТСК (окрашена в коричневый цвет), одновременно связанной с каталитическими остатками S532 и H652 (окрашены в зеленый цвет) в структуре комплекса PSP-ТСК. **В.** Карты электронной плотности двух молекул ТСК (окрашены в зеленый цвет), независимо связанных с каталитическими остатками S532 и H652 (окрашены в оранжевый цвет) в PSPmod.

Дифракционные наборы от кристаллов комплексов были собраны на источниках синхротронного излучения НИЦ «Курчатовский институт» и ESRF (Гренобль, Франция). Сравнение взаимного расположения доменов и остатков каталитической триады в полученных структурах комплексов PSP-ТСК и PSPmod-ТСК проводили так же, как и для свободных белков с использованием подхода, основанного на сочетании интернет-сервисов Dali и PDBePisa. Для сравнения использовали структуры TbOpV в различных конформациях и структуру PSP-S532A в промежуточной конформации.

Согласно проведенному анализу, полученная структура PSP-ТСК представляет собой закрытую конформацию фермента, тогда как в структуре PSPmod-ТСК сохраняется промежуточная конформация.

Как и предполагалось по результатам кинетических исследований, молекула комплекса PSP-ТСК в кристалле содержала одну молекулу ТСК, а молекула комплекса PSPmod-ТСК – две молекулы ТСК (рисунок 9Б и В). В структуре PSP-ТСК одна молекула ингибитора была связана одновременно с остатками S532 и H652 каталитической триады: связывание с S532OG происходит через полуацетальный атом углерода ТСК, а с H652NE2 – через метиленовую группу ТСК (рисунок 9В). Наблюдаемый комплекс PSP-ТСК представляет собой классический способ взаимодействия хлорметилкетонного ингибитора с трипсиноподобной сериновой протеазой.

В структуре PSPmod-ТСК обе молекулы ТСК были связаны с S532OG и H652NE2 через метиленовую группу ТСК. Подобный вид связывания был выявлен впервые. Сравнение молекул ТСК, связанных с S532 в структурах PSPmod-ТСК и PSP-ТСК, показывает, что тозилное ароматическое кольцо и боковая цепь лизина ТСК практически меняются местами, но эта перестановка не изменяет аминокислотное окружение ингибитора, которое включает только остатки из каталитического домена (рисунок 10А).

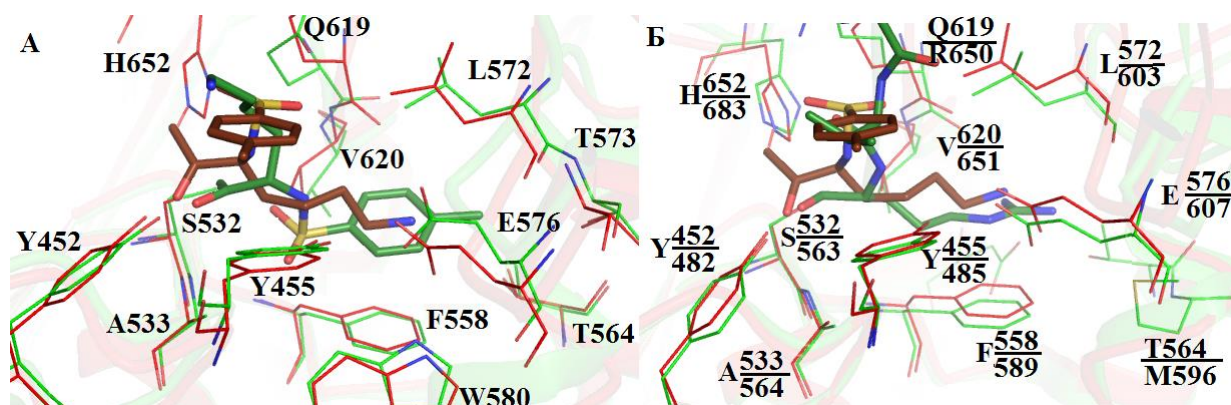


Рисунок 10. Аминокислотное окружение ковалентно связанных ингибиторов в структурах PSP-TCK (PDB ID 7YWP), PSPmod-TCK (PDB ID 7NE7) и TbOpB-AIP (PDB ID 4BP9). **А.** Классическое положение S532- и H652-связанного TCK (коричневый) в субстрат-связывающем кармане PSP в закрытой конформации (красный) и перевернутое положение S532-связанного TCK (зеленый) в субстрат связывающем кармане PSPmod в промежуточной конформации (светло-зеленый). **Б.** Совмещение по Ca атомам комплексов PSP-TCK (красный и коричневый) и TbOpB-AIP (светло-зеленый и зеленый). Аминокислотные остатки в ближайшем окружении (4 Å) ингибиторов выделены и подписаны. Верхние метки соответствуют остаткам PSP, нижние - остаткам TbOpB. Показаны только аргинил P1 и валин P2 от AIP.

Сравнение положения TCK в структуре PSP-TCK с положением AIP (ещё одного ковалентного ингибитора трипсиноподобных сериновых протеаз) в структуре TbOpB-AIP (PDB ID 4BP9) показывает, что остатки, образующие субстрат-связывающие карманы S1 и S2, консервативны и занимают сходные позиции в обеих структурах, а сам комплекс PSP-TCK, как и комплекс TbOpB-AIP, можно рассматривать как аналог переходного тетраэдрического состояния в протеолитической реакции (рисунок 10Б).

3.1.8. Изучение конформации PSP и PSPmod в растворе, а также роли спермина методом МУРР.

Данные МУРР были получены для растворов PSP, PSP в присутствии спермина (PSP-Sp), PSPmod и PSPmodE125A (рисунок 11). Чтобы исключить влияние агрегации на профили МУРР, были проведены измерения при различных концентрациях. Были отобраны данные, полученные при концентрации белка 4,5 мг/мл. Экспериментальные кривые МУРР сравнивали с теоретическими кривыми, рассчитанными для кристаллической структуры PSPmod (7OB1) и гомологичных моделей PSP в открытой и закрытой конформациях. Расчеты проводили с использованием программ FOXS и CRY SOL. Наилучшее соответствие наблюдалось между кривыми для PSP и моделью открытой конформации, а также для PSP-Sp и кристаллической структуры 7OB1, представляющей промежуточную конформацию (рисунок 11).

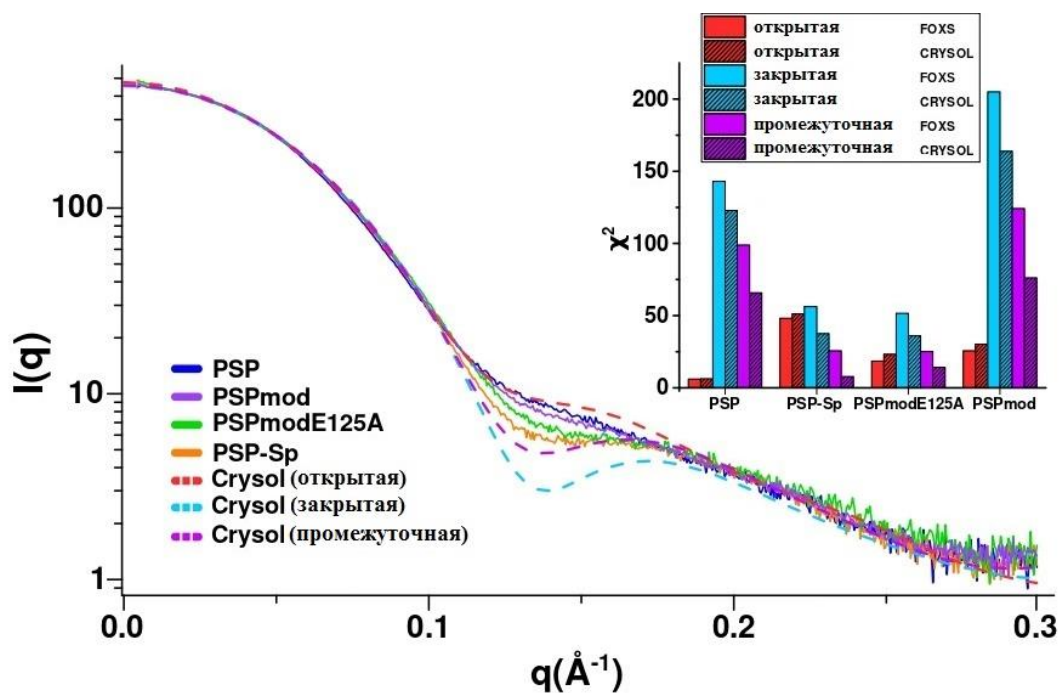


Рисунок 11. Экспериментальные профили МУПП (сплошные линии) и теоретические профили (пунктирные линии), рассчитанные с использованием CRY SOL для гомологичных моделей PSP в открытой и закрытой конформациях и кристаллической структуры (PDB ID 7OB1). На вставке показана гистограмма распределения χ^2 для расчетов FOXS/CRY SOL.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в растворе PSP существует в открытой конформации. При связывании спермина происходит закрытие доменов и стабилизация фермента в промежуточной конформации. Из-за отсутствия субстрата процесс не приводит к формированию активной конфигурации каталитической триады. Конформация PSPmod в растворе близка к PSP, за исключением предполагаемого наличия как открытой, так и промежуточной конформаций в динамическом равновесии. Можно предположить, что наличие фракции белка в промежуточной конформации может благоприятно влиять на процесс нуклеации.

3.1.9 Сравнительный структурный анализ PSP и TbOrB в разных конформациях: стабилизация каталитических триад в закрытой конформации у бактериальных и протозойных OrB

Мы сравнили полученную структуру PSP-ТСК в закрытой конформации со структурой PSP_S532A в промежуточной конформации и МУПП-валидированной моделью PSP в открытой конформации (PSP-МУПП), а также со структурами TbOrB простейших в открытой и закрытой (связанной с ингибитором) конформации (PDB ID 4BP8 и 4BP9 соответственно). Глобальные (междоменные) и локальные (внутридоменные) перестройки, связанные с различными конформациями PSP и TbOrB, показаны на рисунке 12. Как видно из рисунка, при сближении доменов происходит уменьшение объемов междоменных полостей. Взаимное расположение доменов в промежуточной конформации PSP не так сильно отличается от такового в закрытой конформации по сравнению с открытой конформацией (рисунок 12А). Как уже было отмечено у TbOrB и PSP, ковалентное связывание ингибитора (AIP и ТСК) сопровождается сборкой каталитической триады, которая в основном является результатом движения гибкой петли, несущей каталитический остаток Н (Н-петля) (рисунок 12В-Д). За счет перестройки Н-петли каталитический Н смещается с поверхности фермента к центру междоменной полости. Положение каталитического S при этом практически не меняется. А изменение положения каталитического D и всей его

петли, хотя и меняется не столь значительно, но является необходимым условием для встраивания каталитического Н между двумя другими остатками каталитической триады.

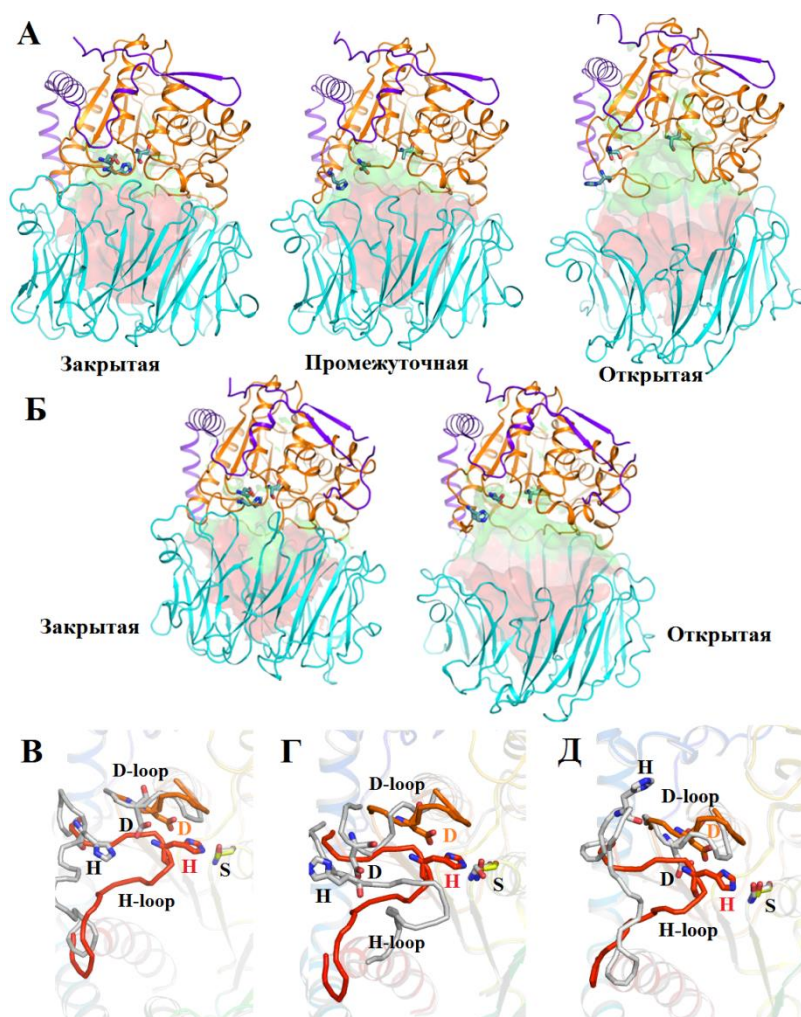


Рисунок 12. Визуализация основных структурных характеристик PSP и TbOrV в различных конформациях. **А.** Представления структур PSP-TCK в закрытой конформации (PDB_ID 7YWP), PSP_S532A в промежуточной конформации (PDB_ID 7ZJZ) и подтвержденная МУРР модель PSP в открытой конформации. N-концевые петли каталитических доменов показаны фиолетовым цветом, β -пропеллерные домены - голубым, а α/β -гидролазные укладки - оранжевым. Остатки каталитической триады показаны изумрудными палочками; молекула ингибитора в структуре 7YWP опущена. Доступные для растворителя области в воронкообразном туннеле β -пропеллера и междоменной полости окрашены в красный и зеленый цвет соответственно. **Б.** Аналогичные представления структур TbOrV в закрытой и открытой конформации (ID PDB 4BP9 и 4BP8 соответственно). **В, Г.** Собранная каталитическая триада в закрытой конформации PSP (радужная окраска), наложенная на разобранную каталитическую триаду (окрашенную серым цветом) в промежуточной (**В**) и открытой (**Г**) конформациях PSP. Каталитические остатки показаны в виде палочек и названы; ковалентно связанный ингибитор опущен. **Д.** Аналогичная суперпозиция собранной и разобранной каталитической триады в закрытой и открытой конформации TbOrV.

Анализ собранной каталитической триады в закрытой конформации в TbOrV показал важную структурную роль двух остатков, не относящихся к активному центру (E172 и R650), при сближении доменов образующих солевой мостик (SM1), который в свою очередь поддерживает правильное пространственное позиционирование каталитических остатков D и H (рисунок 13А).

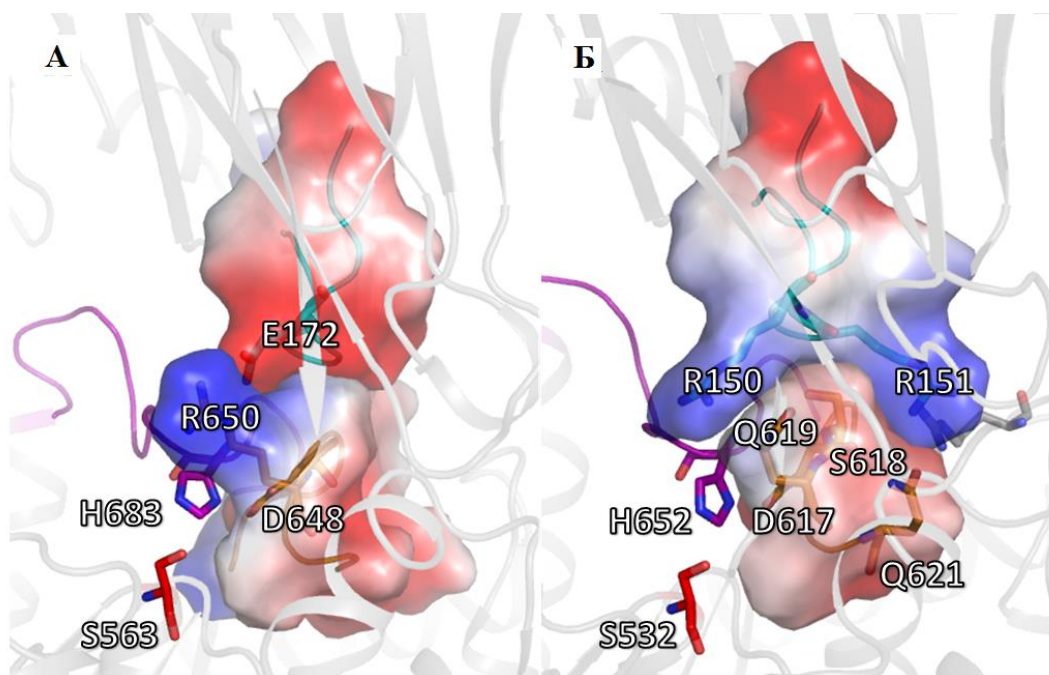


Рисунок 13. Электростатические взаимодействия между D-петлями каталитического домена и петлями, несущей R151/E172 β -пропеллерного домена в закрытой конформации TbOrV (А) и PSP (Б). Петли, несущие каталитические остатки Н и D или остатки R151/E172 окрашены в фиолетовый, оранжевый и голубой цвета соответственно. Аминокислотные остатки L615—Q621 (PSP) и A644—Y653 (TbOrV) из D-петель, а также D146—D154 (PSP) и D167—S175 (TbOrV) из R151/E172-петель показаны в виде поверхностей и окрашены в соответствии с их электростатическим потенциалом. Положительные и отрицательные заряды отмечены синим и красным соответственно. Цветовая шкала в единицах kT/e в диапазоне от -50 до +50.

В PSP этот СМ отсутствует, а функция стабилизации закрытой конформации каталитической триады разделена между парой соседних остатков (R150 и R151) из β -пропеллерного домена и остатками из D-петли и из примыкающей части α 11-спирали (S618, Q619 и Q621). Эти пять остатков образуют две противоположно заряженные комплементарные области на стыке β -пропеллерного и каталитического доменов вместо одного междоменного СМ1, наблюдаемого в TbOrV (рисунок 13Б). Оба типа взаимодействий фиксируют положение D-петель в закрытых конформациях OrV и, следовательно, способствуют ориентации каталитических остатков D и H, благоприятной для образования тетраэдрического комплекса. Таким образом, можно говорить о двух способах стабилизации каталитической триады в TbOrV и PSP: посредством точечного электростатического контакта с высокой разностью зарядов (СМ1) и за счет комплементарных противоположно заряженных поверхностей с низкой разностью зарядов. Это объясняет наблюдение, что в TbOrV оба остатка, образующие СМ1, функционально важны, а в PSP замена R151 не оказывает столь сильного влияния на каталитическую активность, поскольку оставшиеся остатки, по-видимому, компенсируют его отсутствие.

Раздел 3.2 посвящен анализу встречаемости консервативного у протозойных OrV солевого мостика (СМ1) в бактериальных OrV с целью изучения встречаемости двух способов стабилизации собранной каталитической триады (с участием СМ1 и без него), описанных в предыдущей главе. Для решения данной задачи был проведен поиск аминокислотных паттернов E/D-R (как в TbOrV) и R-Q (как в PSP) в 3243 аминокислотных последовательностях бактериальных OrV. Проведенный анализ показал, что сочетание аминокислот E/D-R наблюдается примерно в 34% бактериальных OrV (TbOrV-подобная группа). Сочетание R-Q в соответствующих позициях наблюдается в 53% последовательностей бактериальных OrV (PSP-подобная группа) (рисунок 14).

Только 2% последовательностей содержали в соответствующих позициях комбинации, отличные от E/D-R и R-Q, а короткие (менее 500 аминокислотных остатков) последовательности, не охватывающие все рассматриваемые позиции, составили 11% массива. Вышеперечисленные последовательности, составляющие в совокупности 13% массива, были исключены из дальнейшего анализа.

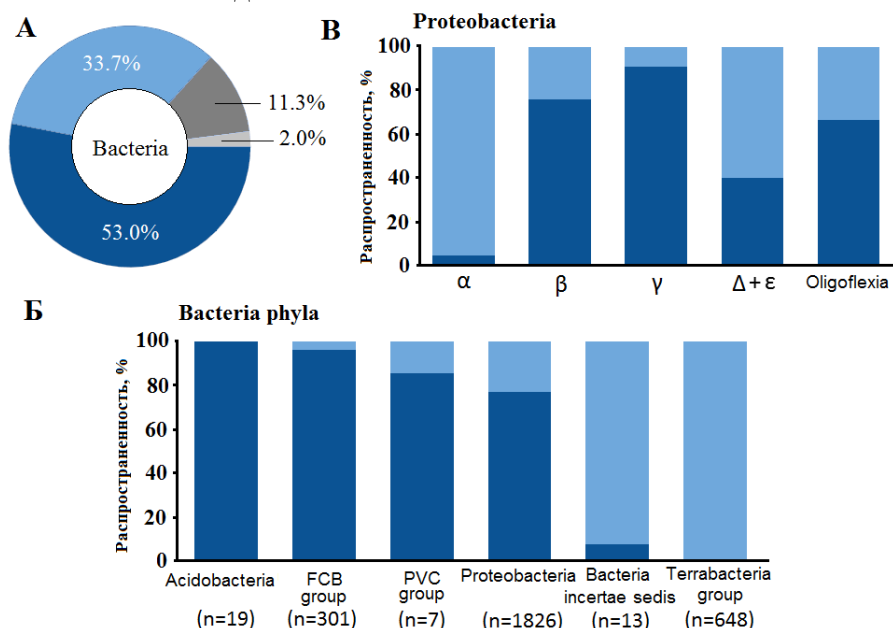


Рисунок 14 Частота встречаемости комбинаций аминокислот R-Q и E/D-R в последовательностях бактериальных ОрВ показана для всего бактериального царства (А), на уровне отделов (Б) и внутри отдела Proteobacteria (В). Синий цвет соответствует сочетанию аминокислот R-Q, светло-голубой - E/D-R. Темный и светло-серый цвета соответствуют последовательностям с другими комбинациями аминокислот в соответствующих позициях и коротким последовательностям, соответственно. В (Б) Acidobacteria обозначает группу Fibrobacteres/Acidobacteria.

Анализ распределения комбинаций E/D-R и R-Q в различных таксономических группах (отделах) бактерий, а также в различных классах самой многочисленной группы протеобактерий (рисунок 15Б, В) показал, что у *Terrabacteria superphylum* и у *Bacteria incertae sedis* наблюдаются в основном ТбОрВ-подобные последовательности, а в группе *Acidobacteria* и FCB - в основном PSP-подобные последовательности. Протеобактериальные ОрВ имеют оба варианта. Комбинация E/D-R преобладает у *Alphaproteobacteria*, в то время как R-Q преобладает у *Gammaaproteobacteria*, основного класса *Proteobacteria*.

Чёткое разделение и высокая репрезентативность как PSP-, так и ТбОрВ-подобных групп побудили к поиску других различий помимо комбинаций E/D-R и R-Q, использованных для начального разделения. Для поиска дополнительных консервативных остатков, были подготовлены консенсусные последовательности для 61 таксономической группы и проведено их множественное выравнивание.

Обнаружено, что в PSP и в PSP-подобной группе, комбинация R-Q была ассоциирована с высоко консервативными остатками R150 и S618 в положениях, предшествующих R151 и Q619, соответственно (рисунок 15). Остатки T613 и Q621, прилегающие к петле, несущей каталитический остаток D617 (D-петля) тоже были высоко консервативны. Нельзя было не отметить, что именно эти остатки участвуют в образовании противоположно-заряженных комплементарных поверхностей, описанных в предыдущей главе.

Дополнительных консервативных остатков, характерных только для ТбОрВ-подобной группы, выявлено не было.

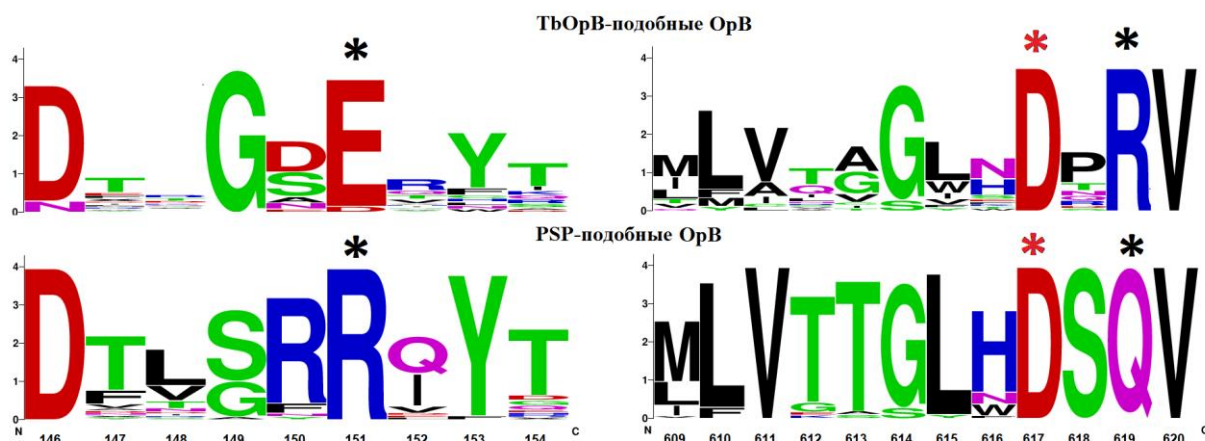


Рисунок 15. Аминокислотные паттерны, окружающие исходные комбинации E/D-R и R-Q в TbOpB- и PSP-подобных группах. Высота букв пропорциональна частоте появления соответствующего остатка. Остатки, способствующие или препятствующие образованию солевого мостика, отмечены черными звездочками, каталитические D – красными звездочками. Нумерация соответствует последовательности PSP.

3.2.1. Стабилизация каталитической триады в моделях PSP- и TbOpB-подобных олигопептидаз B, построенных с помощью программы AlphaFold2

Мы решили проверить, как стабилизируются каталитические триады у случайных представителей бактериальных OpB, принадлежащих либо к PSP-, либо к TbOpB-подобной группе (рисунок 16). Для этой цели мы выбрали ферменты из бактериальных патогенов - возбудителей госпитальных или внутрибольничных инфекций, которые распространяются различными путями среди восприимчивых пациентов в клинической среде. Внутрибольничные инфекции обычно связаны с шестью высоковирулентными и устойчивыми к антибиотикам бактериями: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.*, а также с *Stenotrophomonas maltophilia*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium tuberculosis* и рядом других.

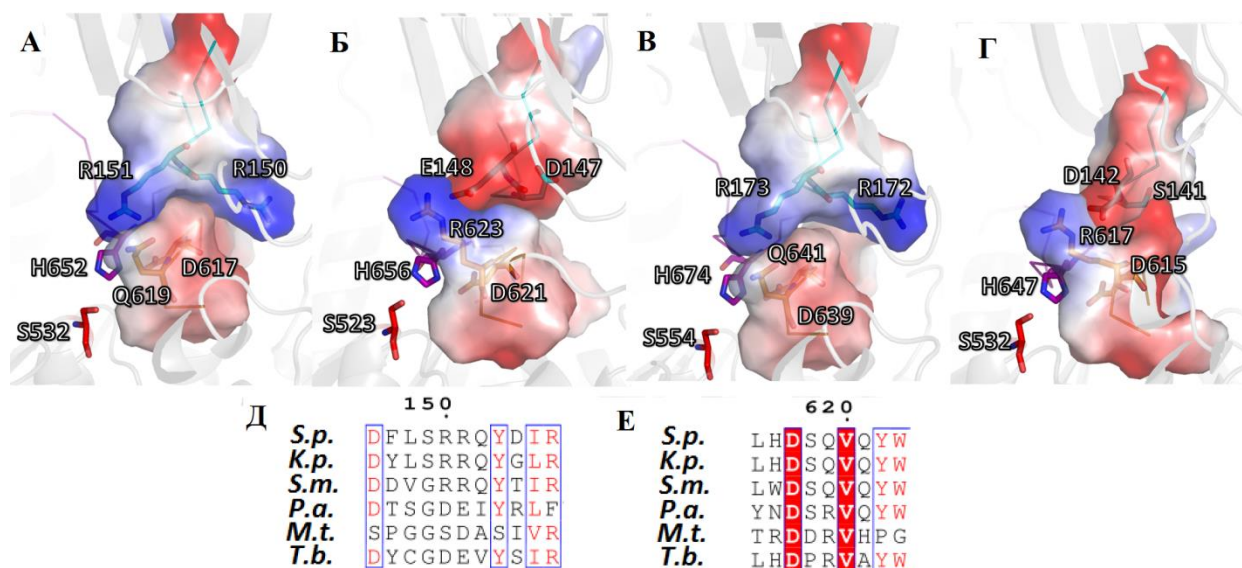


Рисунок 16. Два режима стабилизации каталитических триад в построенных AlphaFold моделях бактериальных OpB из нозокомиальных патогенов. Электростатические взаимодействия между D-петлями каталитических доменов и их противоположными партнерскими R/E-петлями β-пропеллерных доменов показаны для: А. *K. pneumoniae* (К.п.), Б. *P. aeruginosa* (P.a.), В. *S. maltophilia* (S.m.), Г. *M. Tuberculosis* (M.

t.) Петли H, D и R/E окрашены в фиолетовый, оранжевый и голубой цвета соответственно. Аминокислотные остатки 615–621 (K.p.), 619–625 (P.a.), 637–643 (S.m.) и 613–619 (M.t.) из D-петель, а также 146–154 (K.p.), 143–151 (P.a.), 168–176 (S.m.) и 137–145 (M.t.) из R/E-петель показаны в виде поверхностей и окрашены в соответствии с их электростатическим потенциалом. Положительные и отрицательные заряды отмечены синим и красным соответственно. Цветовая шкала в единицах kT/e в диапазоне от -50 до +50°. D, E. Сравнение аминокислотных последовательностей R/E- и D-петель соответственно. Высококонсервативные остатки выделены красным цветом, полуконсервативные - окрашены красным. Соответствующие последовательности из PSP (Sp) и TbOpB (Tb) включены для сравнения. Нумерация осуществляется согласно последовательности PSP.

Последовательности и структуры OpB из *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* и *M. Tuberculosis* были загружены из базы данных UniProt и сопоставлены с таковыми PSP и TbOpB. Все 3D-модели, использованные для сравнительного анализа, были построены с помощью программы AlphaFold2 и представляли ферменты в закрытых конформациях, что позволило оценить способ стабилизации каталитической триады (рисунок 16). Было обнаружено, что OpB из *K. pneumoniae* и *S. maltophilia* несут PSP-подобную комбинацию R-Q, которая в результате наших биоинформатических и структурных исследований была уточнена как паттерн RR-SQ. Подобно PSP, этот паттерн RR-SQ вызывает образование комплементарных противоположно заряженных поверхностей между D-петлями и их противоположными партнерскими петлями из β -пропеллерных доменов (рисунок 16А, В). В свою очередь, OpB из *P. aeruginosa* и *M. tuberculosis* несут TbOpB-подобные аминокислотные паттерны E/D-R, которые образуют CM, аналогичный CM1 у TbOpB (рисунок 16Б, Г).

ВЫВОДЫ

- Получены и охарактеризованы мутантные формы PSP. Установлено, что модификация шарнирного региона в ферменте PSPmod отрицательно влияет на каталитическую активность, но способствует кристаллизации фермента. Установлено, что вторым фактором, способствующим кристаллизации PSP, является присутствие полиамина спермина.
- Методом PCA получены пространственные структуры мутантных форм PSP в промежуточной конформации. Методом МУРР показано, что в растворе PSP имеет преимущественно открытую конформацию, а при добавлении спермина фермент принимает промежуточную конформацию.
- Установлено, что модификация шарнирного пептида мало влияет на общую топологию фермента в кристалле, но приводит к появлению междоменного солевого моста, препятствующего сборке каталитической триады.
- Получены пространственные структуры комплексов PSP и PSPmod с ковалентно связанным ингибитором из группы хлорметилкетонов, продемонстрировано два разных способа связывания ингибитора. Структура PSP в комплексе с ингибитором позволила охарактеризовать закрытую (каталитически-активную) конформация фермента и описать тетраэдрическое переходное состояние.
- Установлен новый способ стабилизации каталитической триады в закрытой конформации PSP, отличный от такового у протозойных ферментов (TbOpB и LmOpB). Показано, что по способу стабилизации каталитической триады в закрытой конформации все бактериальные OpB можно разделить на две группы: PSP-подобные и TbOpB-подобные.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи в журналах

1. **Petrenko, D.E.**; Karlinsky, D.M.; Gordeeva, V.D.; Arapidi, G.P.; Britikova, E.V.; Britikov, V.V.; Nikolaeva, A.Y.; Boyko, K.M.; Timofeev, V.I.; Kuranova, I.P.; Mikhailova, A.G.; Bocharov, E.V.; Rakitina, T.V. Crystal Structure of Inhibitor-Bound Bacterial Oligopeptidase B in the Closed State: Similarity and Difference between Protozoan and Bacterial Enzymes // *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 2286. Scopus, WoS
2. **Petrenko, D.E.**; Timofeev, V.I.; Britikov, V.V.; Britikova, E.V.; Kleymenov, S.Y.; Vlaskina, A.V.; Kuranova, I.P.; Mikhailova, A.G.; Rakitina, T.V. First Crystal Structure of Bacterial Oligopeptidase B in an Intermediate State: The Roles of the Hinge Region Modification and Spermine. // *Biology* 2021, 10, 1021 Scopus, WoS
3. **Петренко Д.Е.**, Николаева А.Ю., Лазаренко В.А., Дороватовский П.В., Тимофеев В.И., Власкина А.В., Корженевский Д.А., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. Поиск условий, способствующих кристаллизации олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans*, методом дифференциальной сканирующей флуориметрии // *Кристаллография*, 2020, 65(2), 266-270 Scopus, WoS
4. **Петренко Д.Е.**, Николаева А.Ю., Лазаренко В.А., Дороватовский П.В., Тимофеев В.И., Власкина А.В., Корженевский Д.А., Михайлова А.Г., Бойко К.М., Ракитина Т.В. Кристаллографические исследования мутантных форм и комплексов олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans*// *Кристаллография*, 2020, 65(6), 907-913 Scopus, WoS
5. Timofeev, V.I.; **Petrenko, D.E.**; Agapova, Y.K.; Vlaskina, A.V.; Karlinsky, D.M.; Mikhailova, A.G.; Kuranova, I.P.; Rakitina, T.V. The Crystal Structure of α -p-tosyl-lysyl Chloromethylketone-Bound Oligopeptidase B from *Serratia Proteamaculans* Revealed a New Type of Inhibitor Binding // *Crystals* 2021, 11, 1438. Scopus, WoS
6. **Петренко Д.Е.**, Тимофеев В.И., Карлинский Д.М., Плащинская Д.Д., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. Изучение свободной энергии связывания пептидных субстратов в активном центре олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* методом ММ-GBSA // *Кристаллография*, 2022, 67(3), 411-418 Scopus, WoS
7. **Petrenko D.E.**, Mikhailova A.G., Timofeev V.I.; Agapova Yu. K., Karlinsky D.M., Komolov, A.S., Korzhenevskiy D.A., Vlaskina A.V., Rumsh, L.D., Rakitina T.V. Molecular dynamics complemented by site-directed mutagenesis reveals significant difference between the interdomain salt bridge networks stabilizing oligopeptidases B from bacteria and protozoa in their active conformations // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2020, 38(16), 4868-4882, Scopus, WoS
8. Britikov, V.V.; Timofeev, V.I.; **Petrenko, D.E.**; Britikova, E.V.; Nikolaeva, A.Y.; Vlaskina, A.V.; Boyko, K.M.; Mikhailova, A.G.; Rakitina, T.V. Elucidation of the Conformational Transition of Oligopeptidase B by an Integrative Approach Based on the Combination of X-ray, SAXS, and Essential Dynamics Sampling Simulation // *Crystals* 2022, 12, 712. Scopus, WoS

Тезисы докладов на конференциях

1. **Petrenko D.E.**; Timofeev V.I.; Mikhailova A.G.; Rakitina T.V. Binding of double-positively charged substrates by *Serratia proteamaculans* oligopeptidase B studied by means of molecular dynamics // the 44th FEBS Congress "From molecules to living systems", Польша, г. Краков, 2019;
2. Корженевский Д.А., **Петренко Д.Е.**, Николаева А.Ю., Тимофеев В.И., Агапова Ю.К., Власкина А.В., Дороватовский П.А., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. Структурные исследования олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* // IX Российский симпозиум «Белки и пептиды», Сочи-Дагомыс, 2019

3. **Петренко Д.Е.**, Николаева А.Ю., Лазаренко В.А., Тимофеев В.И. Получение первой пространственной структуры бактериальной олигопептидазы В // XVI Курчатовская междисциплинарная молодёжная научная школа, Москва, 2019;

4. **Петренко Д.Е.**, Тимофеев В.И., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. Пространственная структура олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* – первая структура бактериальной олигопептидазы В // 63-ья Всероссийская научная конференция МФТИ, г. Долгопрудный, 2020;

5. **Петренко Д.Е.**, Тимофеев В.И., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. Кристаллографические исследования мутантных форм и комплексов олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* // XXXIII Зимняя молодёжная научная школа ИБХ РАН, Москва, 2021.

6. **Петренко Д.Е.**, Бритиков В.В., Бритикова Е.В., Тимофеев В.И., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. Обратное моделирование конформационного перехода олигопептидазы В с помощью комбинации классической молекулярной динамики с методом главных компонент. XXIX Российская конференция по электронной микроскопии. 2022, онлайн.

7. **Петренко Д.Е.**, Тимофеев В.И., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. Модификация шарнирной области олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* подавляет каталитическую активность, но способствует кристаллизации фермента. XXXV Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 2022, Москва.

8. Bershatsky Y., Britikov V., Timofeev V., **Petrenko D.**, Britikova E., Vocharov E., Mikhailova A.G., Rakitina T. Application of X-Ray, SAXS and essential dynamics simulations to study conformational transitions of oligopeptidase B. Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology (BGRS/SB-2022), Новосибирск, 2022 г.

9. **Д.Е. Петренко**, В.И. Тимофеев, А.Г. Михайлова, Т.В. Ракитина. Структурно-функциональный анализ модифицированной олигопептидазы В из бактерий *Serratia Proteamaculans*: роль шарнирной области и спермина в конформационной динамике и кристаллизации. 64-й Всероссийской научной конференции МФТИ, 2021, Москва-Долгопрудный-Жуковский

10. **Петренко Д.Е.**, Агапова Ю.К., Тимофеев В.И., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. Кристаллическая структура связанной с ингибитором Бактериальной олигопептидазы В в закрытом состоянии: сходство и различие ферментов простейших и бактерий. XXXV зимняя молодежная научная школа ИБХ РАН, 2023, Москва

11. **Петренко Д.Е.**, Агапова Ю.К., Тимофеев В.И., Карлинский Д.М., Ракитина Т.В. Сравнение закрытых конформаций бактериальных и протозойных олигопептидаз В. 65-ая Всероссийская научная конференция МФТИ. 2023, Москва