

УДК 577.322.63

Пространственная структура НАД⁺-зависимой формиатдегидрогеназы из бактерий *Moraxella* sp. C-1 при атомном разрешении

И.Г. Шабалин¹, К.М. Поляков^{2,1}, В.И. Тишков¹, В.О. Попов^{1*}¹ Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

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

РЕФЕРАТ Решена с разрешением 1.1 Å кристаллическая структура тройного комплекса НАД⁺-зависимой формиатдегидрогеназы из мезофильной бактерии *Moraxella* sp. C-1 с кофактором (НАД⁺) и ингибитором (ионом азидата), имитирующая структуру переходного состояния ферментативной реакции. Структура уточнена с учетом анизотропии тепловых колебаний неводородных атомов до R-фактора 13.4 %. На основании анализа значений температурных факторов и пиков электронной плотности удалось различить большинство атомов азота, кислорода и углерода, что дало возможность однозначно установить поворотные изомеры боковых цепей остатков гистидина и большинства остатков аспарагина и глутамина. Проведен сравнительный анализ структур тройного комплекса с атомным разрешением и с разрешением 1.95 Å. В структуре атомного разрешения обнаружена тенденция к изменению длин ковалентных связей никотинамидной группы кофактора, согласующаяся с данными квантовомеханических расчетов, указывающими на приобретение кофактором характера биполярной формы в переходном состоянии ферментативной реакции.

Ключевые слова: формиатдегидрогеназа, рентгеноструктурный анализ, атомное разрешение, ферментативный катализ.

ВВЕДЕНИЕ

Формиатдегидрогеназы катализируют реакцию окисления иона формиата до углекислого газа и представляют собой несколько групп ферментов, отличающихся как по четвертичной структуре, так и по наличию простетических групп и кофакторов. Среди формиатдегидрогеназ наиболее простыми по строению ферментами являются НАД⁺-зависимые формиатдегидрогеназы (ФДГ, КФ 1.2.1.2), которые окисляют ионы формиата при сопутствующем восстановлении кофермента НАД⁺ до НАДН [1]:



ФДГ принадлежат к большому суперсемейству D-специфичных дегидрогеназ 2-оксиацетат [2]. Формиатдегидрогеназы данного типа не содержат в активном центре ионов металлов или простетических групп и обладают высокой специфичностью как к НАД⁺, так и к иону формиата. ФДГ из различных организмов (бактерии, дрожжи, растения) функционируют в виде димера, состоящего из двух идентичных субъединиц, имеющих массу от 35 до 50 кДа. Особенностью молекулярного механизма действия ФДГ является прямой перенос гидрид-иона от субстрата на атом С4 никотинамидного кольца НАД⁺ без дополнительных стадий переноса протона, присутствующих в реакциях, катализируемых другими родственными НАД⁺-зависимыми

дегидрогеназами. Поэтому реакция, катализируемая ФДГ, является удобной моделью для изучения механизма переноса гидрид-иона в активном центре НАД⁺-зависимых дегидрогеназ методами квантовой механики и молекулярной динамики [3–5].

Для изучения молекулярного механизма действия большое значение имеют данные по пространственной структуре исследуемого фермента с высокой точностью определения координат индивидуальных атомов. Дифракционные данные с атомным разрешением дают возможность уточнить структуру белка с учетом анизотропии тепловых колебаний отдельных неводородных атомов, что значительно повышает достоверность структурной информации и позволяет определять координаты атомов с точностью порядка 0.02 Å [6]. При этом проявляются тонкие особенности структурной организации активного центра, которые не могут быть выяснены при более низком разрешении.

В настоящее время в базе данных белковых структур (PDB, <http://www.rcsb.org>) депонировано 937 структур белков с атомным разрешением, что составляет около 1.6 % общего числа структур. Структуры с атомным разрешением были решены только для трех представителей НАД⁺-зависимых дегидрогеназ – алкогольдегидрогеназы из печени лошади (5 структур) [7–9], R-специфичной алкогольдегидрогеназы из *Lactobacillus brevis* (3 структуры) [10] и лактатдегидрогеназы из *Plasmodium falciparum* (1

структура) [11]. Имеющиеся пространственные структуры ФДГ были решены с разрешением не выше 1.8 Å для холо-формы [12] и 1.55 Å для апо-формы [13]. В данной работе решена с атомным разрешением (1.1 Å) пространственная структура тройного комплекса формиатдегидрогеназы из метилотрофной бактерии *Moraxella* sp. C-1 (MorФДГ) с кофактором (НАД⁺) и ингибитором (ионом азид), имитирующая структуру переходного состояния ферментативной реакции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кристаллы тройного комплекса MorФДГ-НАД⁺-азид были выращены методом диффузии растворителя через газовую фазу в висячих каплях. Рекомбинантная полноразмерная MorФДГ была экспрессирована и очищена по методике, описанной в [14]. Чистота фермента составила не мене 97 % согласно электрофоретическому анализу в ПААГ. Для кристаллизации использовали раствор MorФДГ с концентрацией 10.5 мг/мл в 0.1 М калий-фосфатном буфере с pH 7.0, содержащем 5 мМ НАД⁺ и 5 мМ азид натрия. Противораствор состоял из 0.1 М Bis-Tris буфера с pH 6.5 и 2.0 М сульфата аммония. Висячие капли объемом 4 мкл готовили смешиванием равных частей раствора белка и противораствора на силиконированном стекле. Стекло с каплей кристаллизационного раствора герметически закрывали ячейку пластикового планшета Linbro фирмы Hampton Research, в которую предварительно помещали 500 мкл противораствора. Планшеты хранили в термостатируемом шкафу при температуре 20 °С. Кристаллы росли в течение двух месяцев. Средние размеры кристаллов составили 0.6 × 0.3 × 0.2 мм (рис. 1).

Дифракционные данные были собраны на длине волны 0.8166 Å с использованием CCD детектора MAR165 на станции X11 накопительного кольца DORIS синхротрона DESY

филиала лаборатории EMBL в Гамбурге. Для уменьшения радиационного разрушения кристалла и повышения разрешения за счет уменьшения амплитуд тепловых колебаний атомов кристалл в процессе сбора данных охлаждался азотом при температуре 100 К на криоустановке CryoJet. Перед замораживанием в струе азота кристалл был помещен на 30 с в криораствор, содержащий 0.1 М Bis-Tris буфер с pH 6.5, 2.3 М сульфат аммония и 30 % (по объему) глицерина. Были собраны два набора дифракционных данных с одного кристалла: первый набор с разрешением 20-1.5 Å с малым временем экспозиции и второй набор с разрешением 20-1.1 Å с большим временем экспозиции. Это позволило избежать потери рефлексов низкого разрешения, интенсивности которых при больших временах экспозиции оказываются переэкспонированными, и измерить с достаточной точностью интенсивности слабых отражений высокого разрешения. Данные обрабатывались программами DENZO и SCALEPACK [15]. Кристаллы принадлежали к пространственной группе C2 с параметрами элементарной ячейки: $a = 79.2 \text{ \AA}$, $b = 66.2 \text{ \AA}$, $c = 74.2 \text{ \AA}$, $\beta = 103.4$ град.

Кристаллы оказались изоморфны кристаллам, использованным для решения структуры тройного комплекса MorФДГ-НАД⁺-азид с разрешением 1.95 Å [14], что позволило использовать в качестве исходной модели уточненную ранее структуру. Кристаллографическое уточнение проводили по программе REFMAC [16]. При уточнении учитывался вклад в рассеивание атомов водорода, координаты которых рассчитывались исходя из стандартной стереохимии аминокислотных остатков и координат соответствующих ковалентно-связанных атомов при каждом цикле уточнения. Для всех неводородных атомов температурные факторы уточнялись в анизотропном приближении. Для визуального контроля за ходом уточнения, внесения изменений в атомную модель структуры и локализации молекул воды использовалась графическая программа COOT [17]. Вносимая корректировка основывалась на анализе разностных синтезов Фурье с коэффициентами $(2|F_o| - |F_c|)$ и $(|F_o| - |F_c|)$, где $|F_o|$ и $|F_c|$ – экспериментальные и рассчитанные модули структурных факторов. Качество белковой модели анализировалось программой PROCHECK [18]. Ошибки координат атомов рассчитывались программой SFHECK [19]. Статистические характеристики набора дифракционных данных и атомной модели приведены в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значительным преимуществом атомного разрешения является большое количество дифракционных данных относительно количества уточняемых параметров, что позволяет уточнять температурные факторы неводородных атомов в анизотропном приближении. В изотропном приближении уточняются только три позиционных параметра и изотропный температурный фактор для каждого неводородного атома. Для уточнения в анизотропном приближении вместо одного параметра изотропного температурного фактора необходимо ввести шесть параметров анизотропного температурного фактора – три параметра для ориентации и три параметра для размера главных осей эллипсоида. Такой подход позволяет значительно точнее интерпретировать дифракционные данные. Включение параметров анизотро-

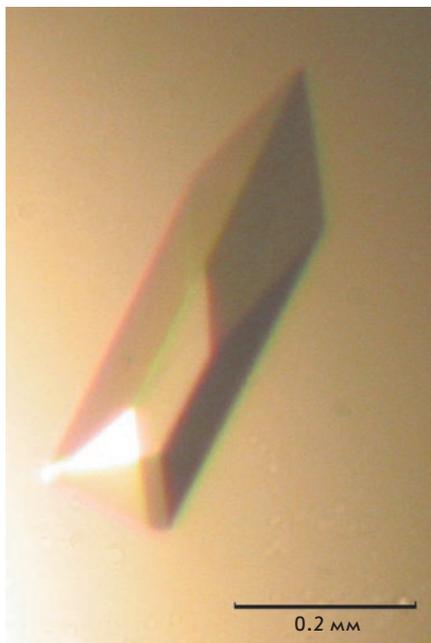


Рис. 1. Фотография кристаллов тройного комплекса MorФДГ-НАД⁺-азид

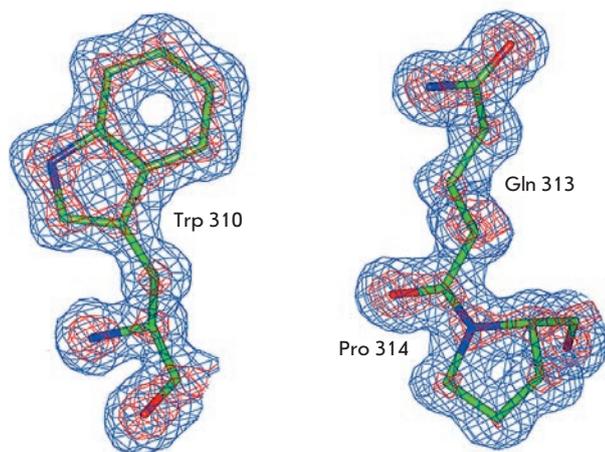


Рис. 2. Карта электронной плотности с коэффициентами $2|F_o| - |F_c|$ для остатков Trp310, Gln313 и Pro314. Уровень среза 1σ (синяя) и 3.5σ (красная)

пии в кристаллографическое уточнение структуры комплекса МорФДГ-НАД⁺-азид снизило R-фактор на 5.3 %, а R_{free} – на 5.2 %. При этом средневзвешенная ошибка координат атомов (DPI) уменьшилась от 0.036 до 0.028 Å. В ранее опубликованной структуре комплекса МорФДГ-НАД⁺-азид с разрешением 1.95 Å эта величина составляет 0.141 Å [14]. Высокое качество электронной плотности структуры с атомным разрешением иллюстрировано на рис. 2.

Ход полипептидной цепи решенной структуры тройного комплекса МорФДГ-НАД⁺-азид представлен на рис. 3. В независимой части элементарной ячейки находится одна субъединица фермента. Молекулу МорФДГ образуют две субъединицы, связанные кристаллографической поворотной осью симметрии второго порядка (рис. 3). В структуре были локализованы 399 аминокислотных остатков, 437 молекул воды, одна молекула НАД⁺, четыре иона азиды и шесть молекул глицерина. При этом молекула НАД⁺ и один ион азиды связаны в активном центре фермента, в то время как три иона азиды и все молекулы глицерина локализованы на поверхности белковой глобулы. Как и в структуре с разрешением 1.95 Å, на С-конце полипептидной цепи фермента были локализованы восемь остатков (392–399), которые не удавалось локализовать по картам электронной плотности в ранее решенной структуре холо-формы ФДГ из бактерии *Pseudomonas* sp. 101 [12]. Тем не менее последние два аминокислотных остатка локализовать не удалось, что скорее всего связано с разупорядоченностью этих остатков.

Среднеквадратичное отклонение по координатам всех Са атомов структур МорФДГ-НАД⁺-азид, решенных при разрешениях 1.1 Å и 1.95 Å, равно 0.30 Å, что свидетельствует об их идентичности. При этом максимальное отклонение составляет 1.1 Å (остаток Ser18). Координаты атомов боковых цепей 18 остатков, локализованных на поверхности белковой глобулы, отличаются более чем на 1 Å, причем максимальное отличие составляет 9 Å (остаток Arg26). Эти различия могут быть вызваны как свойствами

Таблица 1. Статистические характеристики набора дифракционных данных и атомной модели. В скобках приведены значения для последнего слоя разрешения (1.11 – 1.10 Å)

Разрешение, Å	20 – 1.1
Число измеренных рефлексов	586345 (9155)
Число независимых рефлексов	145564 (3662)
Мозаичность, град	0.7
Повторяемость	4.0 (2.5)
Полнота набора, %	96.5 (73.8)
R _{merge} , %	5.1 (52.9)
<I>/<σ(I)>	44 (1.9)
Температурный фактор из графика Вильсона, Å ²	11.5
R-фактор/R _{free} , %	13.4/15.9
Среднеквадратичное отклонение длин валентных связей, Å	0.015
Среднеквадратичное отклонение валентных углов, град	1.7
Минимальная ошибка в координатах атомов, Å	0.014
Средневзвешенная ошибка координат атомов (DPI), Å	0.028
Число неводородных атомов в модели:	
белок	3106
вода	437
лиганды	84
Средний температурный фактор, Å ² :	
всех атомов	20.7
атомов основной цепи	18.1
атомов боковых цепей	20.1
молекул воды	31.8
атомов лигандов	24.9
Число остатков на графике Рамачандрана*:	
в наиболее благоприятных областях	306
в разрешенных областях	33
в запрещенных областях	1 ^o

* За исключением остатков Gly и Pro.

^o Ala198 в структуре ФДГ находится в недопустимой конформации на графике Рамачандрана. Исчерпывающее объяснение необычности конформации этого остатка приведено в [12].

самих кристаллов, выращенных в несколько различных кристаллизационных условиях, так и ошибочным моделированием боковых цепей в структуре с более низким разрешением.

Значительным отличием структуры с атомным разрешением является количество локализованных молекул воды, которых в 2.4 раза больше, чем в структуре с разрешением 1.95 Å (437 и 181 соответственно). При этом 169 молекул воды имеют практически одинаковые позиции в обеих структурах. Фактически, в структуре с разрешением 1.95 Å были локализованы консервативные, высокоупорядоченные молекулы воды, находящиеся внутри полостей белковой глобулы и в первом слое растворителя. Структура с атомным разрешением позволила гораздо более четко и достоверно определить структуру растворителя в кристалле комплекса МорФДГ-НАД⁺-азид.

Благодаря высокой точности дифракционных данных атомное разрешение позволяет более точно идентифицировать альтернативные конформации остатков. В структуре МорФДГ-НАД⁺-азид с разрешением 1.95 Å лишь пять остатков имели две различные конформации. Значительное улучшение качества электронной плотности в структуре с атомным разрешением позволило идентифицировать 10

азид рассматривается как стабильный аналог переходного состояния ферментативной реакции [20, 22].

Данные структуры с атомным разрешением подтвердили, что в активном центре МорФДГ карбоксамидная группа кофактора зафиксирована водородными связями с остатками активного центра в *транс*-конформации (атом O7 направлен в сторону атома C4), которая, согласно квантово-механическим расчетам для газовой фазы, на 2 ккал/моль менее выгодна, чем *цис*-конформация [23]. Кроме того, при анализе уточненной структуры выяснилось, что длина связи C7-O7 карбоксамидной группы кофактора составляет 1.26 Å, что на 0.03 Å больше стандартной длины двойной C-O связи в карбоксамидной группе (1.23 Å) [24]. При этом длина одинарной связи C3-C7 составляет 1.47 Å, что на 0.03 Å меньше стандартной длины (1.50 Å). Поскольку среднеквадратичное отклонение длин валентных связей в структуре составляет 0.015 Å, такие изменения длин связей между атомами с относительно низкими температурными факторами (O7 – 15.6 Å², C7 – 13.7 Å², C3 – 14.1 Å²) в глубине белковой молекулы могут указывать на изменение порядков этих связей. Обнаруженные особенности тройного комплекса МорФДГ-НАД⁺-азид могут отражать важные детали структурной организации переходного состояния реакции, катализируемой ФДГ.

Ранее расчетными теоретическими методами, сочетающими подходы молекулярной динамики и квантовой механики, было показано, что в переходном состоянии катализируемой ФДГ реакции молекула кофактора, находящаяся в энергетически-возбужденной *транс*-конформации, может приобретать характер т.н. биполярной формы [4]. Аналогичное положение было высказано и на основании исследования кинетических изотопных эффектов [21]. При этом должно наблюдаться возрастание отрицательного заряда на атоме O7 карбоксамидной группы, а также уменьшение длины связи C3-C7 и увеличение длины связи C7-O7 по сравнению с молекулой кофактора в свободном состоянии. Данные изменения способствуют увеличению

частичного положительного заряда на атоме C4 кофермента, повышая его электрофильность и тем самым благоприятствуя скорости-лимитирующему переносу гидрид-иона и протеканию ферментативной реакции.

Высокая точность дифракционных данных атомного разрешения дает возможность ослабить влияние стандартной стереохимии на координаты атомов никотинамидной группы кофактора в процессе кристаллографического уточнения структуры. В результате отдельного цикла уточнения программой REFMAC с ослабленными ограничениями на длины связей никотинамидной группы (путем увеличения от 0.02 Å до 0.20 Å стандартного среднеквадратичного отклонения длин этих связей) длина связи C7-O7 составила 1.29 Å, что на 0.06 Å короче стандартного значения, а длина связи C3-C7 составила 1.43 Å, что на 0.07 Å длиннее стандартного значения. Эти различия всего в 1.3 раза больше, чем ошибка в определении длин связей, оцененная как сумма двух средневзвешенных ошибок координат атомов (табл. 1). Тем не менее наши экспериментальные данные отражают тенденцию к изменению длин ковалентных связей, соответствующую приобретению никотинамидной группой кофактора характера биполярной формы в переходном состоянии ферментативной реакции.

Таким образом, впервые проведенное исследование структуры ФДГ при атомном разрешении позволяет глубже понять детали молекулярного механизма действия данного фермента и процессов переноса гидрид-иона в активных центрах НАД⁺-зависимых дегидрогеназ в целом. ●

Настоящая работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (ГК № 02.512.12.2002) и РФФИ (грант № 08-04-00830-а).

Авторы благодарят филиал лаборатории EMBL в Гамбурге за предоставленное время работы на источнике синхротронного излучения и лично Александра Попова за помощь в сборе дифракционных данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тишков В.И., Попов В.О. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 11. С. 1537.
2. Vinals C., Depiereux E., Feytmans E. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. V. 192. № 1. P. 182.
3. Bandaria J.N., Dutta S., Hill S.E., Kohen A., Cheatum C.M. // J. Am. Chem. Soc. 2008. V. 130. № 1. P. 22.
4. Castillo R., Oliva M., Marti S., Moliner V. // J. Phys. Chem. B. 2008. V. 112. № 32. P. 10012.
5. Torres R.A., Schitt B., Bruice T.C. // J. Am. Chem. Soc. 1999. V. 121. № 36. P. 8164.
6. Dauter Z., Lamzin V.S., Wilson K.S. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1997. V. 7. № 5. P. 681.
7. Rubach J.K., Plapp B.V. // Biochemistry. 2003. V. 42. № 10. P. 2907.
8. Meijers R., Morris R.J., Adolph H.W., Merli A., Lamzin V.S., et al. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 12. P. 9316.
9. Meijers R., Adolph H.W., Dauter Z., Wilson K.S., Lamzin V.S., et al. // Biochemistry. 2007. V. 46. № 18. P. 5446.
10. Schlieben N.H., Niefind K., Muller J., Riebel B., Hummel W., et al. // J. Mol. Biol. 2005. V. 349. № 4. P. 801.
11. Cameron A., Read J., Tranter R., Winter V.J., Sessions R.B., et al. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 30. P. 31429.
12. Lamzin V.S., Dauter Z., Popov V.O., Harutyunyan E.H., Wilson K.S. // J. Mol. Biol. 1994. V. 236. № 3. P. 759.
13. Schirwitz K., Schmidt A., Lamzin V.S. // Protein Sci. 2007. V. 16. № 6. P. 1146.
14. Shabalina I.G., Filippova E.V., Polyakov K.M., Sadykhov E.G., Safonova T.N., et al. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2009. V. 65. № 12. P. 1315.
15. Otwinowski Z., Minor W. // Methods in enzymology. 1997. V. 276. P. 307.
16. Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 1997. V. 53. № 3. P. 240.
17. Emsley P., Cowtan K. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2004. V. 60. № 12. P. 2126.
18. Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M. // J. Appl. Cryst. 1993. V. 26. № 2. P. 283.
19. Vaguine A.A., Richelle J., Wodak S.J. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 1999. V. 55. № 1. P. 191.
20. Blanchard J.S., Cleland W.W. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 15. P. 3543.
21. Rotberg N.S., Cleland W.W. // Biochemistry. 1991. V. 30. № 16. P. 4068.
22. Popov V.O., Lamzin V.S. // Biochem. J. 1994. V. 301. № 3. P. 625.
23. Kahn K., Bruice T.C. // J. Am. Chem. Soc. 2001. V. 123. № 48. P. 11960.
24. Engh R.A., Huber R. // Acta Crystallogr. A Found. Crystallogr. 1991. V. 47. № 4. P. 392.