

УДК 577.1 577.15

Моделирование трехмерной структуры гидролазы эфиров альфа-аминокислот из *Xanthomonas rubrilineans*

С. А. Зарубина^{1,2}, И. В. Упоров¹, Е. А. Федорчук^{1,2}, В. В. Федорчук^{1,2}, А. В. Складенко⁴,
С. В. Яроцкий⁴, В. И. Тишков^{1,2,3*}

¹Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

²ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559, Москва, Цимлянская ул., 16, оф. 96

³Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, корп. 2

⁴Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ГосНИИгенетика), 117545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1

*E-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 11.06.2013

РЕФЕРАТ Гидролаза эфиров альфа-аминокислот (АЕН, [КФ 3.1.1.43]) является перспективным биокатализатором синтеза β -лактамных антибиотиков – как пенициллинов, так и цефалоспоринов. Ранее в нашей лаборатории был клонирован ген АЕН из *Xanthomonas rubrilineans* (ХрАЕН). В представленной работе с целью рационального дизайна ХрАЕН методом гомологичного моделирования построена структура этого фермента и проведен анализ его активного центра. Идентифицированы остатки, образующие каталитическую триаду (Ser175, His341 и Asp308), а также остатки, входящие в оксианионный центр (Tyr83 и Tyr176) и карбоксилатный кластер (карбоксильные группы остатков Asp311, Asp209 и Glu310). Показано, что оптимальная конформация остатков каталитической триады реализуется при суммарном заряде карбоксилатного кластера, равного -1 . С помощью докинга получены структуры комплексов ХрАЕН с ампициллином, амоксициллином, цефалексином, метиловыми эфирами *D*-фенилглицина и 4-окси-*D*-фенилглицина. С помощью моделирования комплексов фермента с различными субстратами проведен анализ полученных структур и определен ряд антибиотиков, при синтезе которых фермент ХрАЕН будет наиболее эффективен.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гидролаза эфиров альфа-аминокислот, *Xanthomonas rubrilineans*, компьютерное моделирование, докинг, ферментативный синтез антибиотиков, белковая инженерия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АЕН – гидролаза эфиров α -аминокислот (alpha-amino acid ester hydrolase); РА – пенициллинацилаза; ХрАЕН, ХсАЕН, АсАЕН – гидролазы эфиров α -аминокислот из *Xanthomonas rubrilineans*, *X. citri*, *Acetobacter turbidans* соответственно; DPG – *D*-фенилглицин; Met-DPG – метиловый эфир DPG.

ВВЕДЕНИЕ

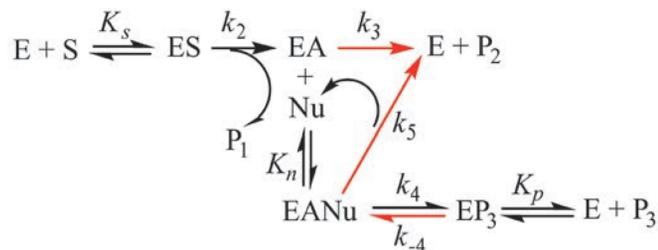
Полусинтетические β -лактамные антибиотики широко используются для борьбы с патогенными микроорганизмами и занимают более половины мирового рынка всех антибактериальных препаратов [1]. В настоящее время эти антибиотики получают с использованием фермента пенициллинацилазы (РА), который катализирует реакцию переноса ацильной группы из соответствующего амида на β -лактамное ядро (схема) [2, 3]. В случае РА донорами ацильной части служат амиды, которые обладают меньшей реакционной способностью по сравнению с соответствующими эфирами. Поэтому процесс образования ацил-

фермента (стадия с константой k_2) может протекать гораздо быстрее, если источником ацильной группы служит соответствующий эфир, однако для этого необходимо использовать гидролазу, а не амидазу, каковой является РА. Поскольку гидролаза более активна с эфирами, а целевой продукт – амид, то скорость побочной реакции его гидролиза (стадия с константой k_3), катализируемой гидролазой, будет более низкой по сравнению с амидазой, что должно повысить соотношение скоростей синтеза/гидролиза. Таким образом, использование гидролазы вместо амидазы позволяет повысить эффективность процесса синтеза антибиотиков сразу на двух этапах.

Один из таких ферментов – гидролаза, специфичная к эфирам α -аминокислот (АЕН, [КФ 3.1.1.43]). В отличие от пенициллинацилаз, выделенных и охарактеризованных из большого количества источников, данных об АЕН совсем немного. В настоящее время опубликована информация об АЕН, выделенных из бактерий *Acetobacter turbidans* ATCC 9325 (ActAEN) [4, 5], *Xanthomonas citri* IF0 3835 (XcAEN) [6], *X. campestris pv. campestris* ATCC 33913 [7] и ряда других источников. В базе трехмерных структур Protein Data Base (PDB) представлены структуры только двух ферментов, проявивших наибольшую активность в синтезе антибиотиков – ActAEN и XcAEN. В случае XcAEN имеется структура только свободного фермента дикого типа (PDB ID: 1MPX, разрешение 1.9 Å) [6]. В случае ActAEN имеется как структура свободного фермента дикого типа (PDB ID: 2B9V, разрешение 2.0 Å), так и в комплексе с *D*-фенилглицином (PDB ID: 2B4K, 3.3 Å), а также мутанта ActAEN Y206A (PDB ID: 1RYU, разрешение 2.8 Å) и комплекса неактивного мутанта ActAEN S205A с ампициллином (PDB ID: 1NX9, разрешение 2.2 Å) [5].

Нами недавно был клонирован ген *AEN* из бактерий *X. rubrilineans* (XrAEN). Этот штамм был выделен в Государственном научном центре по антибиотикам. Фермент был успешно экспрессирован в клетках *Escherichia coli*. Предварительные эксперименты подтвердили высокую эффективность рекомбинантной XrAEN в синтезе ряда антибиотиков, однако для эффективного практического применения фермента необходимы дополнительные эксперименты по инженерии XrAEN, направленные на улучшение свойств с заданными субстратами. Один из наиболее эффективных подходов белковой инженерии – метод рационального дизайна. Этот метод предполагает введение в белковую глобулу точечных аминокислотных замен, которые выбирают на основе анализа трехмерной структуры биокатализатора. Для того чтобы использовать этот метод, необходимо иметь структуру исследуемого фермента, которая может быть получена как экспериментально (с помощью рентгеноструктурного анализа или ЯМР), так и с помощью компьютерного моделирования. Последний подход все чаще используется в настоящее время благодаря развитию методов компьютерного моделирования и непрерывному росту числа определенных экспериментально структур в банке PDB.

Цель данной работы состояла в построении модельной структуры XrAEN – как свободного фермента, так и в комплексе с ключевыми соединениями, используемыми при синтезе β -лактамных антибиотиков.



Общая кинетическая схема синтеза β -лактамных антибиотиков [2]. E – фермент; S – субстрат, донор ацильной части; ES – фермент-субстратный комплекс; EA – ацилфермент; P₁ и P₂ – продукты гидролиза субстрата S; Nu – нуклеофил, EANu – комплекс ацилфермента с нуклеофилом, EP₃ – комплекс фермента и целевого антибиотика, P₃ – целевой антибиотик. K_s – константа диссоциации комплекса фермента с субстратом; K_n – константа диссоциации комплекса ацилфермента с нуклеофилом; K_p – константа диссоциации фермента с продуктом синтеза антибиотика; k₂ – константа скорости образования ацилфермента; k₃ – константа скорости гидролиза ацилфермента; k₄, k₋₄ – прямая и обратная константы скорости химической стадии образования и гидролиза целевого антибиотика соответственно; k₅ – константа скорости гидролиза комплекса ацилфермента с нуклеофилом

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выравнивание аминокислотных последовательностей XrAEN и известных структур АЕН проводили с помощью программы BioEdit Sequence Alignment Editor ClustalW Multiple Alignment [8].

Компьютерная модель трехмерной структуры XrAEN получена методом гомологичного моделирования с использованием пакета программ Insight II. В качестве базовой использовали структуру АЕН из *X. citri* (XcAEN), представленную в базе PDB, с кодом 1MPX (разрешение 1.9 Å) [6]. Далее для снятия возможных конформационных напряжений структуры была проведена оптимизация структуры с помощью молекулярной механики (модуль Discover_3 пакета программ Insight II, 300 шагов минимизации, силовое поле CVFF [9]). Окончательная оптимизация структуры выполнена с помощью молекулярной динамики (5 пс при температуре 298 К). Докинг субстратов и продуктов в активный центр модельной структуры XrAEN проводили методом Монте-Карло с помощью модуля Docking пакета программ Insight II. В дальнейшем была выполнена оптимизация структуры – 300 шагов минимизации (силовое поле CVFF) и молекулярная динамика (1 пс при температуре 298 К).

Для получения изображений белковой глобулы, а также комплексов с субстратами использовали пакет программ Accelrys Discovery Studio 2.5 [10].

	65	75	85	95	105	115
<i>X. rubrilineans</i>	LHTVIVLPGK	AHGAPILLTR	TPYDASGRAS	RLA-SPHMRD	LLPQGDEVFV	DGGYIRVVFQD
<i>X. citri</i>	LHTVIVLPGK	AKNAPIVLTR	TPYDASGRTE	RLA-SPHMKD	LLSAGDDVFV	EGGYIRVVFQD
<i>X. oryzae</i>	LHTVIVLPGK	AKNAPIVLTR	TPYDASGRTE	RLA-SPHMKD	LLSAGDDVFV	EGGYIRVVFQD
<i>X. campestris</i>	LHTVIVLPGK	ARNAPIVLTR	TPYDASGRTE	RLA-SPHMKD	LLSAGDDVFV	EGGYIRVVFQD
<i>A. turbidans</i>	LYTVIVIPKN	ARNAPILLTR	TPYNAKGRAN	RVPNALTMRE	VLPQGDDVFV	EGGYIRVVFQD
	125	135	145	155	165	175
<i>X. rubrilineans</i>	IRGKYGSEGD	YVTRPLRGP	LNPTKVDHAT	DAWDTIDWLK	KHVPESNGKV	GMIGSSYEYGF
<i>X. citri</i>	VRGKYGSEGD	YVMTRPLRGP	LNPSEVDHAT	DAWDTIDWLK	KNVSESNQKV	GMIGSSYEYGF
<i>X. oryzae</i>	VRGKYGSEGD	YVMTRPLRGP	LNPSEVDHAT	DAWDTIDWLK	KNVSESNQKV	GMIGSSYEYGF
<i>X. campestris</i>	VRGKYGSEGE	YVMTRPLRGA	LNPSEVDHAT	DAWDTIDWLK	KNLKESENGKV	GMIGSSYEYGF
<i>A. turbidans</i>	IRGKYGSQGD	YVMTRPPHGP	LNPTKTDETT	DAWDTVDWLK	HNVPESENGRV	GMTGSSYEYGF
	185	195	205	215	225	235
<i>X. rubrilineans</i>	TVVVALADPH	PALKVAAPES	PMIDGWMGDD	WLNYGAFRQV	NLDYFTGQMT	RRGKGEGIPR
<i>X. citri</i>	TVVVALTNPV	PALKVAAPES	PMIDGWMGDD	WFNYGAFRQV	NFDYFTGQLS	KRGKGAGIAR
<i>X. oryzae</i>	TVVVALTNPV	PALKVAAPES	PMVDGWMGDD	WFNDGAFRQV	NFDYFTAQLS	KRGKGAGIPR
<i>X. campestris</i>	TVVVALTNPV	PALKVAAPES	PMIDGWMGDD	WFNYGAFRQV	NFDYFTGQLS	KRGKGAGIPR
<i>A. turbidans</i>	TVVVALLDPH	PALKVAAPES	PMVDGWMGDD	WFHYGAFRQV	AFDYFVSQMT	ARGGGNDIPR
	245	255	265	275	285	295
<i>X. rubrilineans</i>	QGYDDYSNFL	RAGSAGDYAK	AAGLEQLPWW	HKLTEHPAYD	AFWQEQLADK	VMARTPLKVP
<i>X. citri</i>	QGHDDYSNFL	QAGSAGDFAK	AAGLEQLPWW	HKLTEHAAYD	AFWQEQLADK	VMARTPLKVP
<i>X. oryzae</i>	QGDDYSNFL	QAGSAGDFAK	AAGLEQLPWW	HKLTEHAAYD	AFWQEQLADK	VMARTPLKVP
<i>X. campestris</i>	QGHDDYSNFL	QAGSAGDFAK	AAGLEQLPWW	HKLTEHAAYD	SFWQEQLADK	VMARTPLKVP
<i>A. turbidans</i>	RDADDYTNFL	KAGSAGSFAT	QAGLDQYPFV	QRMHAHPAYD	AFWQGGALDK	ILAQKPTVP
	305	315	325	335	345	355
<i>X. rubrilineans</i>	TMWLQGLWQ	EDMWGAIHSY	EAMEPRDTGN	DKNYLVMGPV	RHSQVNYEGA	SLGALQDFGD
<i>X. citri</i>	TMWLQGLWQ	EDMWGAIHSY	AAMEPRDKRN	TLNYLVMGPV	RHSQVNYDGS	ALGALNFEFGD
<i>X. oryzae</i>	TMWLQGLWQ	EDMWGAIHSY	AAMEPRDKSN	TLNYLVMGPV	RHSQVNYDGS	ALGALSFEFGD
<i>X. campestris</i>	TMWLQGLWQ	EDMWGAIHSY	AAMEPRDKSN	KLNYLVMGPV	RHSQVNSDAS	SLGALNFDGD
<i>A. turbidans</i>	MLWEQGLWQ	EDMWGAIHAW	QALKDADVKA	P-NLTVLVMGPV	RHSGVNYNGS	TLGPLEFEFGD

Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей XrAEN, AEN из *X. citri*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* и *A. turbidans* в районе активного центра. Красным цветом выделены остатки каталитической триады, фиолетовым – два остатка Tyr из оксианионного центра и зеленым – три остатка карбоксилатного кластера

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа включала в себя следующие этапы:

- множественное выравнивание аминокислотной последовательности XrAEN с известными последовательностями AEN для выявления консервативных участков, в первую очередь остатков активного центра, и выбора оптимальной структуры, используемой в качестве базовой;
- построение трехмерной структуры XrAEN методом гомологичного моделирования с использованием опорного фермента, выбранного на предыдущем этапе;
- уточнение полученной структуры фермента XrAEN;
- встраивание в модельную структуру XrAEN различных субстратов и продуктов ферментативной реакции.

Выравнивание аминокислотных последовательностей AEN из различных источников

Известно, что на точность моделирования в первую очередь влияют два фактора – степень гомологии между моделируемым и опорным ферментами, чья структура используется в качестве базовой, а также разрешение базовой структуры. Кроме того, даже при высокой гомологии точность моделирования будет сильно зависеть от количества и длины разрывов/вставок в выравнивании аминокислотных последовательностей моделируемого и опорного ферментов. Чем их меньше – тем выше будет точность моделирования. Поэтому для выбора базовой структуры нами проведено выравнивание аминокислотной последовательности нашего фермента и последовательностей двух AEN с известными структурами –

из *X. citri* (XcAEN) и *A. turbidans* (ActAEN), а также двух высокогомологичных АЕН из *X. campestris pv. campestris* и *X. oryzae*. Отметим, что опубликованы также данные об АЕН из *A. pasteurianus*, по аминокислотной последовательности полностью идентичной ActAEN, поэтому в выравнивании она не приведена.

Результаты выравнивания представлены на *рис. 1*. Из данных по выравниванию следует, что наиболее высокой гомологией по отношению XrAEN обладает XcAEN (84%). Чуть меньше она у АЕН из *X. campestris pv. campestris* и *X. oryzae* (83%). Гомология между XrAEN и ActAEN намного ниже – 62%. Кроме того, из *рис. 1* видно, что в выравнивании аминокислотных последовательностей исследуемого фермента и других АЕН бактерий рода *Xanthomonas* отсутствуют делеции и вставки, в то время как в случае ActAEN в выравнивании имеется одна делеция и одна вставка из одного аминокислотного остатка каждая.

Таким образом, исходя из результатов выравнивания, из двух экспериментально определенных структур – ActAEN и XcAEN, в качестве опорной была выбрана структура фермента XcAEN (PDB ID: 1MPX [6]). Кроме того, выбранная структура XcAEN 1MPX имеет немного более высокое разрешение, чем структура свободной ActAEN 2B9V (1.9 и 2.0 Å соответственно).

Анализ активного центра XrAEN

Данные выравнивания аминокислотных последовательностей позволили определить также функционально важные остатки активного центра XrAEN. В отличие от пенициллинацилазы G (PA), состоящей из двух различных субъединиц, XrAEN представляет собой гомотетрамер из четырех идентичных субъединиц, в каждой из которых находится свой активный центр. Согласно данным рентгеноструктурного анализа [4–7], характерной особенностью гидролаз эфиров α -аминокислот является присутствие в их структуре трех ключевых групп аминокислотных остатков:

1) системы переноса протона для активации каталитического остатка серина. Это классическая каталитическая триада для сериновых гидролаз, у фермента XrAEN она образована остатками Ser175, His341 и Asp308 (*рис. 1*);

2) оксианионного центра, который в XrAEN формируется двумя остатками Tyr83 и Tyr176, и необходим для стабилизации отрицательного заряда на остатке каталитического Ser175;

3) карбоксилатного кластера, в который входят три карбоксильные группы двух остатков аспарагиновой кислоты (Asp311, Asp209) и одного остатка глутаминовой кислоты (Glu310). Отрицательно заряженный карбоксилатный кластер участвует в свя-

зывании положительно заряженной аминогруппы ацильной части субстрата в α -положении, что и обеспечивает высокую специфичность XrAEN именно к α -аминокислотам.

Кроме того, функционально важным является остаток Tyr223, который участвует в связывании фенильной части субстрата благодаря стэкинг-взаимодействию, что способствует правильной ориентации субстрата в активном центре фермента.

Компьютерное моделирование структуры XrAEN

Построение трехмерной структуры XrAEN выполняли в два этапа. Сначала методом гомологичного моделирования с помощью сервера SWISS-MODEL получили предварительную структуру тетрамерного фермента XrAEN [11]. Далее эту структуру дополнительно оптимизировали, для чего была выполнена релаксация структуры, чтобы снять возможные конформационные напряжения с помощью 300 шагов минимизации с использованием модуля Discover_3 пакета программ Insight II. Анализ структуры активного центра в полученной на данном этапе модельной структуре XrAEN показал, что взаимная ориентация остатков Ser175, His341 и Asp308, составляющих каталитическую триаду, неоптимальна для осуществления каталитической функции (*рис. 2А,Б*, остатки показаны желтым цветом). Из *рис. 2* видно, что карбоксильная группа остатка Asp308 обращена в сторону от имидазольного кольца His341. Было высказано предположение, что возможной причиной такой неоптимальной ориентации является слишком большой отрицательный заряд, присвоенный при проведении моделирования отрицательно заряженному карбоксилатному кластеру, состоящему из карбоксильных групп остатков Asp209, Glu310 и Asp311. Первоначально в исходной структуре всем карбоксильным группам в остатках карбоксилатного кластера было присвоено по отрицательному заряду, что привело к образованию суммарного заряда –3. Известно, что при сближении карбоксильных групп в полимерах, как правило, не происходит полной диссоциации всех групп. Поэтому, предполагая, что суммарный заряд на карбоксилатном кластере равен –2 (*рис. 2А,Б*, остатки показаны серым цветом) и –1 (*рис. 2А,Б*, остатки показаны красным цветом), нами была проведена дополнительная оптимизация структуры. Из *рис. 2А,Б* видно, что по мере уменьшения общего отрицательного заряда на карбоксилатном кластере наблюдается все более близкая к правильной ориентация карбоксильной группы остатка Asp308 из каталитической триады относительно имидазольного кольца His341, при этом также в направлении имидазольного кольца His341 происходит движение и ОН-группы каталитического остатка

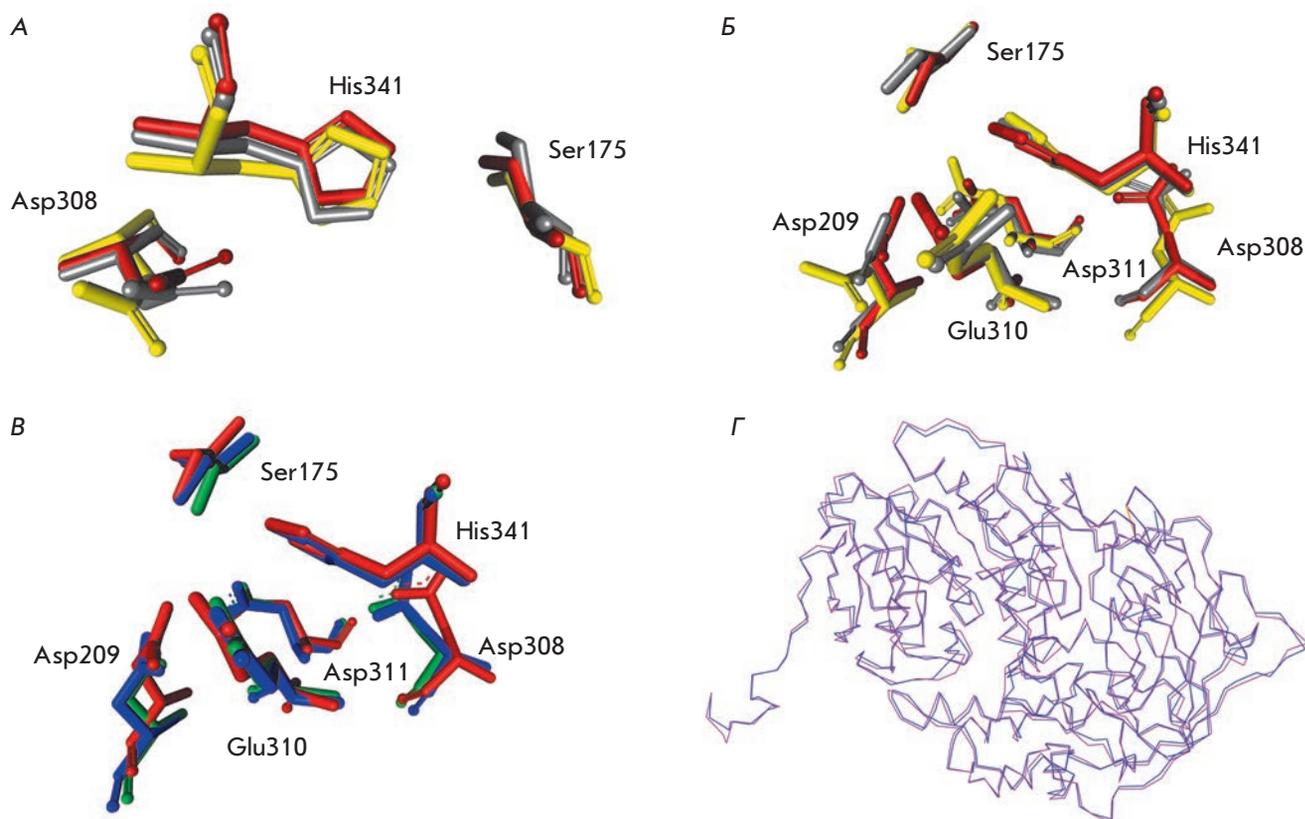


Рис. 2. А и Б – оптимизация структуры активного центра в модельной структуре XrAEN. Показаны взаимная ориентация только остатков каталитической триады и взаимная ориентация остатков каталитической триады и карбоксилатного центра (А и Б соответственно). Желтым, серым и красным цветом показаны остатки в структурах, в которых суммарный заряд на карбоксилатном кластере составлял -3 , -2 и -1 соответственно. В – наложение остатков активного центра и карбоксилатного кластера в модельной структуре XrAEN (показаны красным цветом) и в экспериментальных структурах XcAEN и ActAEN (показаны зеленым и синим цветом соответственно). Г – наложение C_{α} -атомов структур XrAEN и XcAEN (показаны фиолетовым и синим цветом соответственно). Нумерация остатков дана по последовательности XrAEN

Ser175 (рис. 2А). В результате все остатки, входящие в каталитическую триаду, имеют оптимальную конфигурацию для осуществления реакции. Кроме того, одного отрицательного заряда на карбоксилатном кластере вполне достаточно для связывания положительно заряженной аминокислотной группы субстрата. После связывания на карбоксилатном кластере не будет отрицательного заряда, который отрицательно влиял на диссоциацию ОН-группы каталитического остатка Ser175.

На рис. 2В представлены результаты наложения остатков каталитической триады и карбоксилатного кластера оптимизированной модельной структуры XrAEN по отношению к аналогичным остаткам в структурах ActAEN и XcAEN, определенных с помощью рентгеноструктурного анализа (PDB ID: 2B9V [5] и 1MPX [6] соответственно). Из рис. 2В хо-

рошо видно, что пространственное расположение остатков активного центра во всех трех структурах практически идентично: одинаковые положения занимают каталитические остатки Ser175 и His341 и карбоксилатного кластера, при этом отмечено только очень небольшое отклонение в конформации Asp308.

На рис. 2Г приведено наложение положений C_{α} -атомов в структурах XrAEN и XcAEN. Видно, что общий фолдинг наложенных ферментов практически одинаков, причем наименьшее отклонение наблюдается в районе активного центра, а наибольшее – на периферии белковой глобулы. Среднее квадратичное отклонение C_{α} -атомов между модельной структурой XrAEN и опорной структурой XcAEN составило всего 0.7 \AA . В случае наложения структур XrAEN и ActAEN среднее квадратичное отклонение

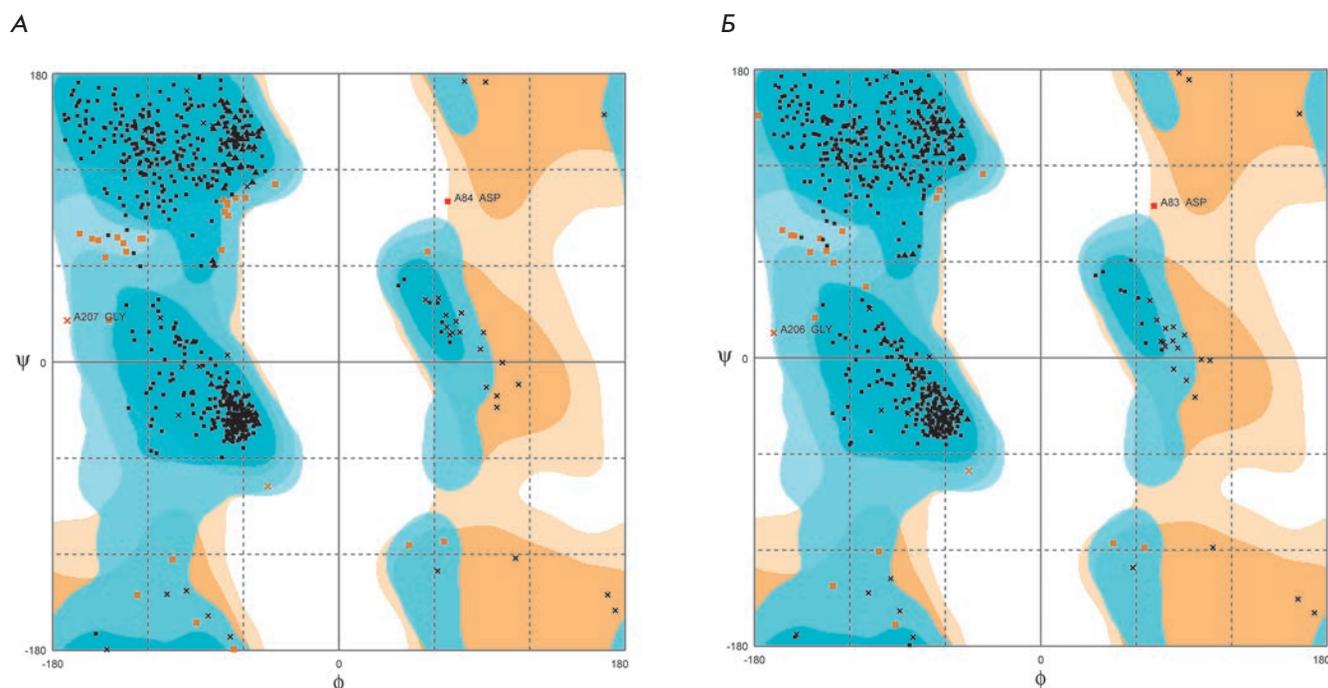


Рис. 3. Карта Рамачандрана для модельной структуры XrAEN (А) и экспериментально определенной структуры апо-XcAEN PDB 1MPX (Б). Разница в обозначениях остатков на единицу связана с тем, что в последовательности XrAEN учтен первый остаток Met, а в работе [6] использована нумерация аминокислотных остатков без остатка Met

составляет 1.1 Å, что и следовало ожидать из-за более низкой гомологии между этими ферментами.

Далее был проведен сравнительный анализ полученной модельной структуры с целью выявления остатков с неоптимальной конфигурацией. Были построены карты Рамачандрана для модельной структуры XrAEN и экспериментальной структуры XcAEN (рис. 3А,Б соответственно). Из рис. 3 хорошо видно, что большинство остатков в обеих структурах находятся в оптимальных областях значений углов ψ и ϕ . Фактически в неоптимальной конформации находится только один остаток – Asp84 в XrAEN и Asp83 в XcAEN, причем значения углов ψ и ϕ этого остатка в модельной и экспериментальной структурах очень близки. Этот остаток расположен около входа в активный центр и находится в области изгиба между α -спиралью и β -тяжом (рис. 4А). Это означает, что существует некоторая напряженность между данными субъединицами. Причина такого отклонения от неоптимальных значений углов в настоящее время неясна. Однако следует отметить, что подобные отклонения очень часто встречаются в случае остатков, расположенных именно в изгибах, соединяющих элементы вторичной структуры. Например, такие же значения углов ψ и ϕ имеет остаток Ala198 в формиаатдегидрогеназе из бактерии *Pseudomonas* sp. 101 дикого типа [PDB 2NAC].

Таким образом, представленные данные позволяют сделать вывод, что модельная структура XrAEN достоверна, построена с высокой точностью и хорошо согласуется со структурой опорного фермента XcAEN, а также со структурой ActAEN. На рис. 4 приведена структура мономерного и тетрамерного фермента для докинга субстратов и продуктов в активный центр фермента.

Докинг субстратов и продуктов в активный центр XrAEN

На следующем этапе мы провели встраивание ряда субстратов и продуктов в активный центр XrAEN. Процедура докинга описана в «Экспериментальной части». В связи с тем, что в банке трехмерных структур представлены данные только для свободного апофермента гидролазы XcAEN – наиболее близкого структурного гомолога нашего фермента, полученные в результате докинга структуры комплексов XrAEN сравнивали с использованием аналогичных или близких экспериментально определенных структур ActAEN.

Для ActAEN в PDB имеется структура его комплекса с *D*-фенилглицином (DPG) (PDB ID: 2B4K [5]). Однако в случае XrAEN больший интерес представляет структура в комплексе с метиловым эфиром

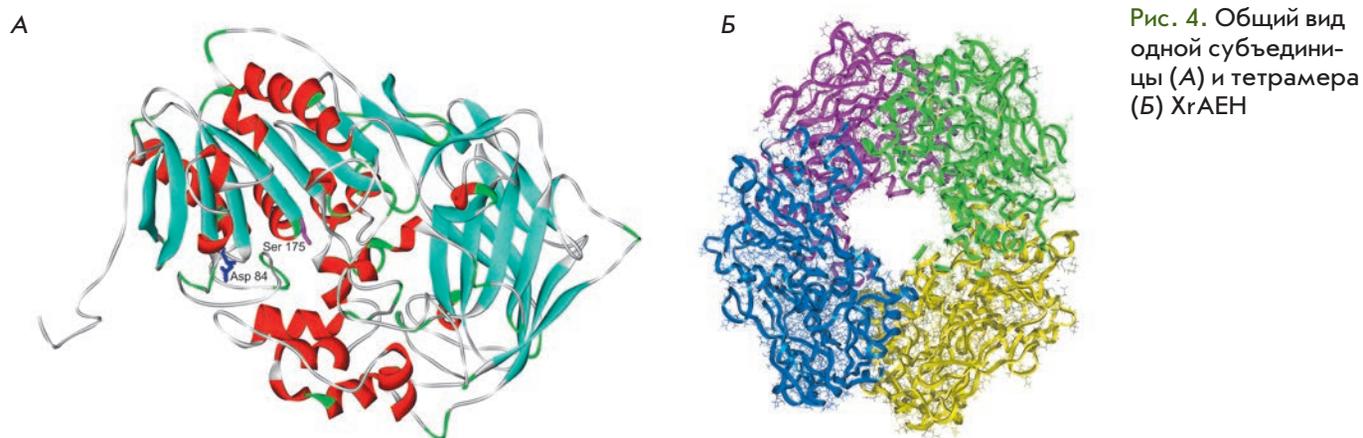


Рис. 4. Общий вид одной субъединицы (А) и тетрамера (Б) XrAEN

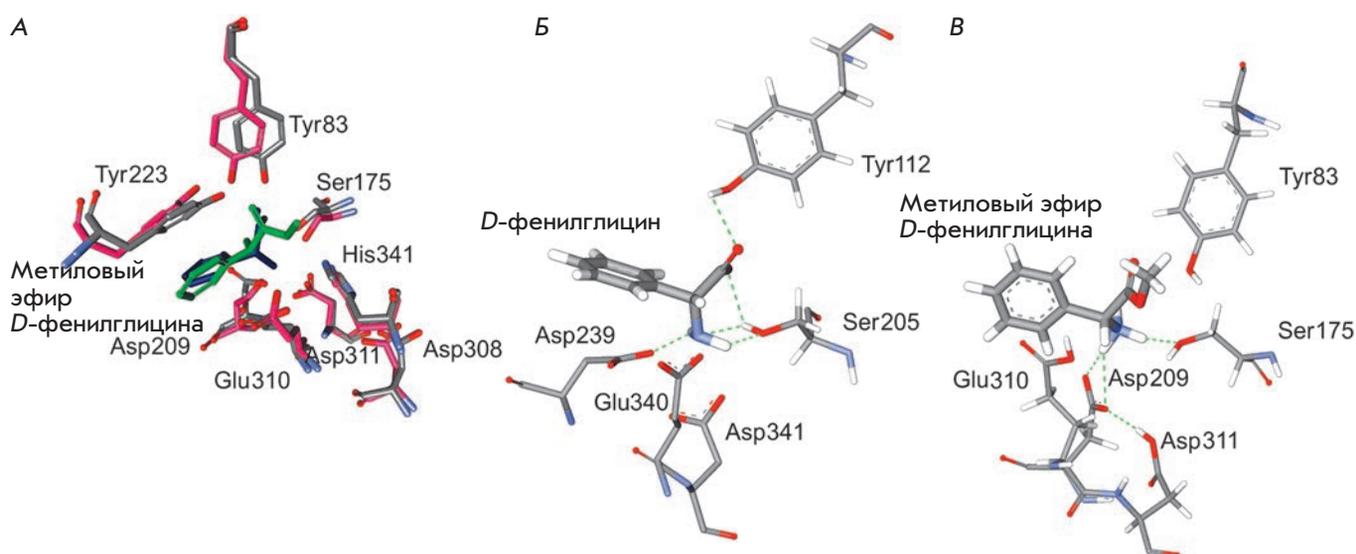


Рис. 5. А – наложение структур комплексов Met-DPG с XrAEN и DPG с ActAEN. Розовым цветом выделен фермент ActAEN, серым – XrAEN, зеленым – субстрат Met-DPG, синим – DPG. Нумерация остатков дана по последовательности XrAEN. Б и В – взаимодействие остатков активного центра со связанным лигандом в комплексах ActAEN с DPG и XrAEN с Met-DPG соответственно

D-фенилглицина (Met-DPG), который применяют в качестве ацилирующего агента при синтезе ампициллина с помощью АЕН. На рис. 5А представлено наложение полученной структуры со структурой 2В4К. Видно, что общий фолдинг структур двойных комплексов очень близок, среднее квадратичное отклонение C_{α} -атомов всей белковой глобулы составляет 1.1 Å (напомним, что среднее квадратичное отклонение C_{α} -атомов всей белковой глобулы свободных ферментов XrAEN и ActAEN также составляло 1.1 Å). Кроме общего фолдинга также наблюдается практически полное совпадение конформаций ряда остатков активного центра (имидазольное кольцо остатка His341 и карбоксильная группа остатка Asp308 из каталитической триады, карбоксильные группы

остатков карбоксилатного центра Glu310 и Asp311). Однако из результатов наложения видно, что существуют заметные различия в конформации ряда других остатков. В первую очередь, это гидроксильная группа каталитического остатка Ser175 и фенольная группа остатка Tyr83 из оксианионного центра, а также аминокетильная группа субстрата Met-DPG. Детальный анализ экспериментальной и модельной структур (рис. 5Б,В), в которых также показаны атомы водорода, позволяет легко объяснить эти различия. В экспериментальной структуре 2В4К (рис. 5Б) мы имеем комплекс ActAEN с продуктом реакции, в котором остатки активного центра Ser205 и Tyr112 (Ser175 и Tyr83 в XrAEN соответственно) находятся в состоянии крайне неоптимальном для катализа – во-

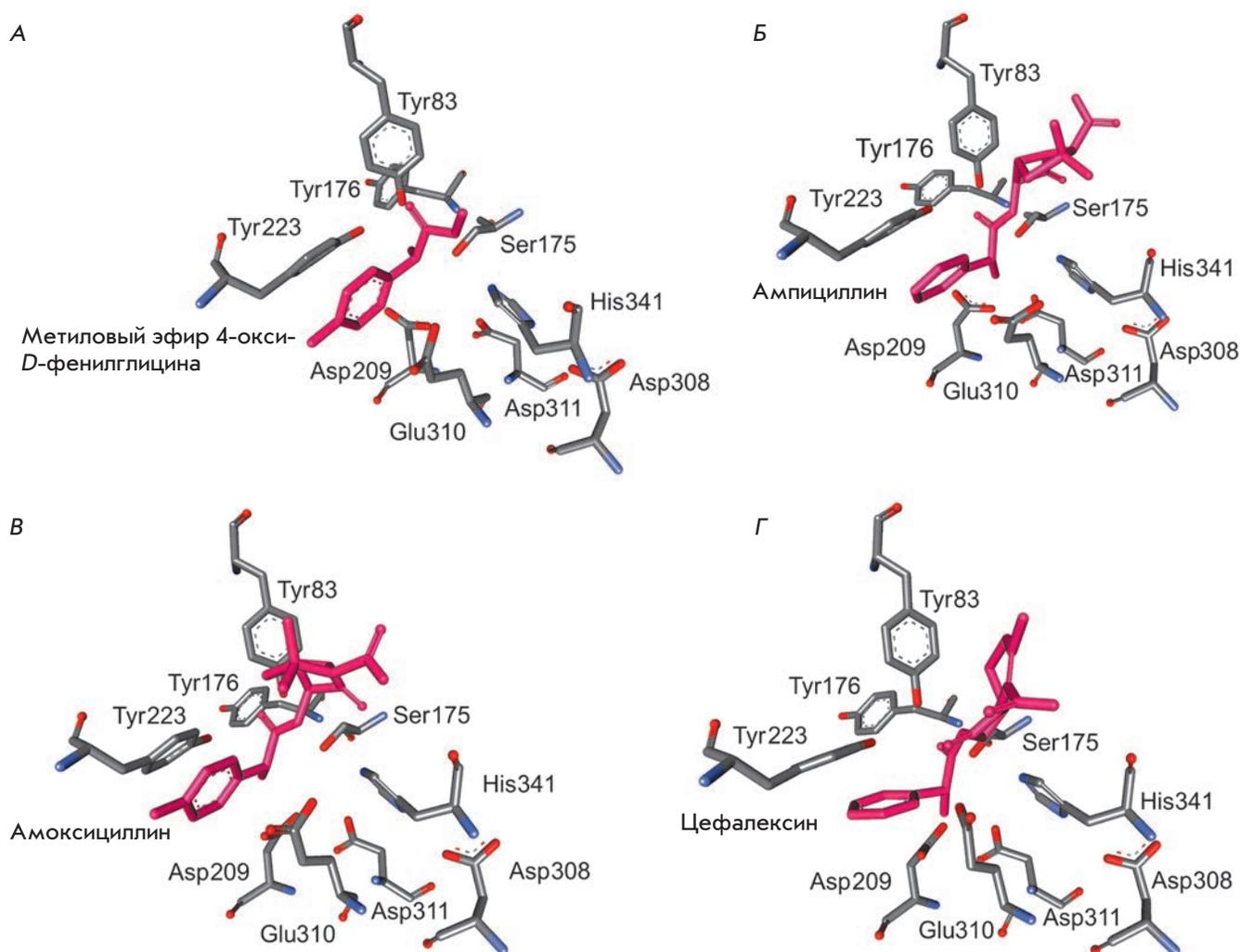


Рис. 6. Докинг метилового эфира 4-окси-*D*-фенилглицина, ампициллина, амоксициллина и цефалексина в активный центр XrAEN (соответственно А – Г)

дород оксигруппы фенольного кольца Tyr112 образует водородную связь с кислородом карбоксильной группы DPG. В результате это фенольное кольцо зафиксировано вдали от оксигруппы каталитического Ser205 и в такой конформации просто не способно выполнять роль оксианионного центра. В свою очередь, сама оксигруппа каталитического Ser205 участвует в образовании трех водородных связей, причем водород этой группы за счет двух водородных связей повернут в сторону имидазольного кольца остатка His, который акцептирует этот протон для получения отрицательно заряженного атома кислорода на остатке Ser, необходимого для осуществления катализа. Кроме того, аминогруппа DPG также повернута в сторону от карбоксилатного центра за счет двух водородных связей с гидроксидом каталитического Ser205. В ре-

зультате только одна карбоксильная группа остатка Asp239 (Asp209 в XrAEN) также взаимодействует с аминогруппой DPG (рис. 5Б).

Совершенно иная картина наблюдается в модельной структуре XrAEN с субстратом Met-DPG (рис. 5В). Из рис. 5В хорошо видно, что фенольная группа остатка Tyr83 находится в конформации, оптимальной для выполнения роли оксианионного центра, кислород оксигруппы каталитического остатка Ser175 образует всего одну водородную связь, а атом водорода этой группы развернут в сторону имидазольного кольца остатка His341 из системы переноса протона. Расстояние между атомом Oγ Ser175 и атакуемым атомом углерода в субстрате составляет всего 2.9 Å, а угол атаки равен 115.1°, что близко к значению 109.5°, оптимальному для тетраэдриче-

Численные результаты моделирования связывания субстратов и продуктов ферментативной реакции в активном центре фермента XrAEN

Встраиваемая молекула	Расстояние от Oγ Ser175, Å	Углы атаки атома Oγ Ser175, град
Метилловый эфир <i>D</i> -фенилглицина	2.9	115.1
Ампициллин	2.7	80.9
Метилловый эфир 4-окси- <i>D</i> -фенилглицина	2.9	128.4
Амоксициллин	3.0	103.2
Цефалексин	2.9	73.0

ской конформации. Таким образом, полученная модель комплекса Met-DPG с XrAEN, с точки зрения конфигурации, оптимальна для осуществления катализа. Несколько иная картина наблюдается в случае комплекса XrAEN с метиловым эфиром 4-окси-*D*-фенилглицина, который используется в качестве донора ацильной группы при синтезе амоксициллина (рис. 6А). Наличие дополнительной оксигруппы в ароматическом кольце этого субстрата приводит к тому, что при его встраивании в активный центр фермента возникают небольшие стерические затруднения. В результате угол атаки между углеродом карбоксила и атомом Oγ Ser175 увеличивается до 128.4° (таблица), что конечно хуже, чем в случае Met-DPG, но вполне достаточно для эффективного протекания реакции.

Нами также проведено моделирование структур комплексов XrAEN с целевыми продуктами реакции синтеза антибиотиков: ампициллином и амоксициллином (группа пенициллинов) и цефалексином (группа цефалоспоринов). Результаты докинга представлены на рис. 6Б–Г. Согласно результатам наложения структур комплексов ампициллина и амоксициллина с XrAEN, среднеквадратичное отклонение C_α-атомов всей белковой глобулы составляет всего 0.005 Å, однако конформации антибиотиков, связанных в активном центре, различаются. Как и в случае субстратов – доноров ацильной части, расстояние от атома Oγ каталитического остатка Ser175 фермента до амидного углерода продукта (он же углерод карбоксила в субстрате) составляет 2.7, 3.0 и 2.9 Å для ампициллина, амоксициллина и цефалексина соответственно,

однако углы совсем разные. В случае ампициллина величина угла составляет 80.9°, что намного меньше оптимального значения 109.5°. Для цефалексина (угол 73.0°) эта разница еще больше. Таким образом, вероятность гидролиза этих двух антибиотиков в активном центре XrAEN очень низкая, что нельзя сказать про амоксициллин, у которого угол атаки 103.2° близок к оптимальному. Это означает, что в случае амоксициллина соотношение скоростей синтез-гидролиз (и, как следствие, выход целевого продукта) будет ниже, чем у ампициллина, что хорошо согласуется с экспериментальными данными [12], полученными при изучении эффективности рекомбинантного фермента в процессах синтеза этих антибиотиков. Однако отметим, что по абсолютным показателям эффективность рекомбинантной XrAEN в процессе синтеза амоксициллина была выше, чем у пенициллинацилазы из *E. coli*.

Таким образом, в данной работе нами построена модельная структура новой гидролазы эфиров α-аминокислот из *X. rubrilineans*, а также получены модельные структуры комплексов этого фермента с рядом субстратов и продуктов. Анализ этих структур показал хорошее соответствие с известными экспериментальными данными как для этого фермента, так и для других AEN, что свидетельствует о высокой точности моделирования. Наиболее интересны, с нашей точки зрения, результаты моделирования структуры комплекса XrAEN с амоксициллином, гораздо более эффективным (и более дорогостоящим) антибактериальным препаратом, чем ампициллин. Именно поэтому амоксициллин используется в комплексе с клавулановой кислотой, ингибитором β-лактамаз (коммерческие названия «Амоксиклав» и «Аугментин»). Как уже отмечалось выше, используемая в настоящее время пенициллинацилаза является эффективным биокатализатором синтеза ампициллина, но она и гораздо менее эффективна в синтезе амоксициллина. Поэтому поиск и разработка новых биокатализаторов синтеза амоксициллина является одной из актуальных задач фармацевтической промышленности. Наличие модельной структуры комплекса XrAEN с амоксициллином открывает возможность увеличения эффективности XrAEN в синтезе амоксициллина с помощью рационального дизайна – одного из наиболее эффективных методов белковой инженерии. ●

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (госконтракт № 14.512.11.0066) и РФФИ (грант № 11-04-00962-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Elander R.P. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. V. 61. № 5–6. P. 385–392.
2. Youshko M.I., Moody H.M., Bukhanov A.L., Boosten W.H.J., Švedas V.K. // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. V. 85. № 3. P. 323–329.
3. Tishkov V.I., Savin S.S., Yasnaya A.S. // *Acta Naturae.* 2010. V. 2. № 3(6). P. 47–61.
4. Barends Th.R.M., Polderman-Tijmes J.J., Jekel P.A., Willams Ch., Wybenga G., Janssen D.B., Dijkstra B.W. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 9. P. 5804–5810.
5. Polderman-Tijmes J.J., Jekel P.A., Jeronimus-Stratingh C.M., Bruins A.P., van der Laan J.-M., Sonke Th., Janssen D.B. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 32. P. 28474–28482.
6. Barends Th.R.M., Polderman-Tijmes J.J., Jekel P.A., Hensgens C.M.H., de Vries E.J., Janssen D.B., Dijkstra B.W. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 25. P. 23076–23084.
7. Blum J.K., Bommarius A.S. // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2010. V. 67. № 1–2. P. 21–28.
8. Hall Th.A. // *Nucl. Acids Symp. Ser.* 1999. V. 41. № 1. P. 95–98.
9. Dauber-Osguthorpe P., Roberts V.A., Osguthorpe D.J., Wolff J., Genest M., Hagler A.T. // *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 1988. V. 4. № 1. P. 31–47.
10. Discovery Studio 2.5 // <http://accelrys.com/products/discovery-studio/>
11. Kiefer F., Arnold K., Künzli M., Bordoli L., Schwede T. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. Suppl 1. P. D387–D392.
12. Yarotsky S.V., Sklyarenko A.V. // *Proc. VII Moscow Intern. Congress «Biotechnology: State of the Art and Prospects Development», March 19–22, 2013. Moscow. Russia. Part 2.* P. 142–143.