

УДК 577.152.351, 577.151.02

# Биоинформатический анализ и молекулярное моделирование участия Lys65 в каталитической триаде D-аминопептидазы из *Ochrobactrum anthropi*

И. Г. Халиуллин<sup>1,2</sup>, Д. А. Суплатов<sup>1</sup>, Д. Н. Шалаева<sup>1</sup>, М. Оцука<sup>3</sup>, Я. Асано<sup>3</sup>, В. К. Швьядас<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, 1, стр. 73<sup>2</sup>Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, 1, стр. 3<sup>3</sup>Центр биотехнологических исследований Университета префектуры Тояма, Имизу, Тояма 939-0398, Япония

\*E-mail: vytas@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 23.04.2010 г.

**РЕФЕРАТ** Биоинформатический и филогенетический анализ семейства пенициллин-связывающих белков, включающего D-аминопептидазы, амидазы D-аминокислот, DD-карбоксипептидазы и бета-лактамазы, показывает, что D-аминопептидаза из *Ochrobactrum anthropi* обладает достоверным сходством с другими ферментами и содержит консервативные для всего семейства аминокислотные остатки: S62, K65, Y153, N155, H287, G289. Три из них: каталитический Ser62, Lys65 и Tyr153 – образуют триаду переноса протона, обеспечивающую активацию обобщенного нуклеофила активного центра фермента в процессе катализа. Молекулярное моделирование показало, что консервативный остаток Lys65 имеет необычно низкое значение pKa, которое подтверждено экспериментальным исследованием pH-профиля каталитической активности D-аминопептидазы. Полученные данные позволили установить роль остатка Lys65 в механизме действия D-аминопептидазы как общего основания, ответственного за передачу протона от каталитического остатка Ser62 к остатку Tyr153 и обратно на стадиях образования и расщепления промежуточного ацилфермента.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** D-аминопептидаза, семейство пенициллин-связывающих белков, биоинформатический анализ, механизм действия.

## ВВЕДЕНИЕ

D-аминопептидаза из *Ochrobactrum anthropi* является уникальным ферментом по своему строению и свойству катализировать расщепление широкого ряда производных D-аланина с высокой стереоспецифичностью [1]. Фермент представляет собой сериновую гидролазу и действует в виде гомодимера, субъединицы которого организованы в трехдоменную структуру. Каталитический домен фермента имеет т.н. бета-лактамазное строение [2]. Сравнение аминокислотных последовательностей также обнаруживает сходство D-аминопептидазы с такими ферментами, как DD-карбоксипептидаза и бета-лактамаза [3].

Механизм действия D-аминопептидазы в литературе не обсуждался, однако при рассмотрении этого вопроса можно принять во внимание предположения, относящиеся к другим ферментам семейства – амидазе D-аминокислот из *Ochrobactrum anthropi*, а также бета-лактамазам и пенициллин-связывающим белкам. Имеются разные представления о каталитическом механизме функцио-

нирования пенициллин-связывающих белков, в которых различные остатки активного центра, расположенные недалеко от каталитического серина, рассматриваются как потенциальные кандидаты на роль общего основания в ходе ферментативной реакции [4–6]. Выбирая между этими остатками, необходимо, с одной стороны, учитывать pH-профиль каталитической активности и, с другой стороны, принимать во внимание влияние окружения такого остатка на его pK, поскольку общее основание должно действовать в депротонированной форме.

При помощи гибридных методов КМ/ММ в работе [7] было проведено детальное исследование процесса деацилирования в ферментах семейства пенициллин-связывающих белков на примере двух представителей: DD-пептидазы R61 из *Streptomyces* sp. и бета-лактамазы P99 класса C из *Enterobacter cloacae*. Был сделан вывод о главенствующей роли остатка тирозина активного центра на стадии деацилирования каталитического остатка серина этих ферментов.

Обобщая литературные данные, следует сказать, что до сих пор не существует четкого представления о механизме действия D-аминопептидазы. Целью настоящей работы было применение методов биоинформатики и молекулярного моделирования для выяснения роли аминокислотного остатка Lys65 в каталитической триаде D-аминопептидазы из *Ochrobactrum anthropi*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы и методы экспериментального исследования

Выделение и очистка фермента проведена по методике, описанной ранее [1]. Хромогенный субстрат – *n*-нитроанилид D-аланина (D-Ala-pNA) – продукт компании Bachem. Компонент буферного раствора трис(гидроксиметил)аминометан (Tris) степени чистоты research grade – компании Serva Electrophoresis.

Кинетические исследования проводили с использованием интегрального метода слежения за накоплением продукта реакции в условиях полного превращения субстрата. Обработку интегральных кривых накопления продукта проводили линеаризацией полученных данных в координатах  $t/\ln(p_{\infty}/(p_{\infty}-p)) - p/\ln(p_{\infty}/(p_{\infty}-p))$ , где  $t$  – время,  $p$  – концентрация продукта в данный момент времени,  $p_{\infty}$  – концентрация продукта после окончания реакции гидролиза. Данная анаморфоза позволяет найти значения отношений  $K_M/V_{max}$  и  $1/V_{max}$  как наклон прямой и отсекаемый от оси ординат отрезок соответственно. Нелинейную регрессию зависимости  $V_{max}/K_M$  от pH и расчет экспериментальных значений pKa проводили в программе SciDAVis [8].

Ферментативную реакцию гидролиза инициировали добавлением небольшого количества раствора фермента к смеси, содержащей субстрат в концентрации, превышающей значение  $K_M$  примерно в 4 раза. Реакцию проводили в термостатируемой при 25 °C спектрофотометрической кювете объемом 500 мкл и длиной оптического пути 1 см. Изменения поглощения регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1601 в режиме Kinetics при длине волны 450 нм. Конечное значение поглощения во всех экспериментах не превышало 2 оптических единицы.

Для поддержания заданного значения pH в реакционной смеси ферментативную реакцию проводили в 0.1 М буферных растворах Tris-HCl. При приготовлении буферных растворов использовали стеклянный pH-чувствительный электрод Hamilton Slimtrode.

### Методы биоинформатического анализа

**Поиск по гомологии.** Во всех процедурах поиска по гомологии в качестве затравки использовали структуру D-аминопептидазы из *Ochrobactrum anthropi* 1E15 из банка данных PDB или содержащуюся в ней аминокислотную последовательность. Обнаружение сходства по первичной структуре проводили с помощью программы PSI-BLAST [9] v. 2.2.18 по базе данных Non-redundant. Полученные структуры выравнивали с помощью алгоритмов t-coffee [10], mafft [11] и probcons [12], объединенных посредством статистики позиционной устойчивости (Consistency Objective Function), реализованной в программе t-coffee. Последо-

вательности, идентичные более чем на 95 %, группировали в кластеры, из которых для последующего анализа отбирали только одного представителя.

Обнаружение сходства по третичной структуре проводили с помощью программы SSM [13] по всему банку данных белковых структур PDB. Полученные результаты дискриминировали на основании процента совпавших элементов вторичной структуры при наложении на структуру 1E15. Финальную выборку анализировали в рамках трехмерного выравнивания, выполненного программой MUSTANG [14].

**Биоинформатический анализ.** Филогенетический анализ полученных выравниваний по структурам и по последовательностям проводили с помощью пакета программ PHYLIP [15]. Конструирование филогенетических деревьев проводили методом поиска ближайшего соседа по матрице парных расстояний. Биоинформатический анализ проводили с помощью оригинального программного обеспечения ZEBRA v. 3.2. При этом отбор результатов осуществляли на уровне статистической достоверности  $2.2 \times 10^{-43}$ .

**Визуализация.** Для просмотра выравниваний по первичным структурам использовали программу Jalview [16]. Для визуализации трехмерного выравнивания использовали программу PyMol [17]. Генерацию изображения филогенетического дерева выполняли с помощью программы PHYLIP [15]. Генерацию логотипов участков первичной структуры осуществляли с помощью интернет-ресурса WebLogo [18].

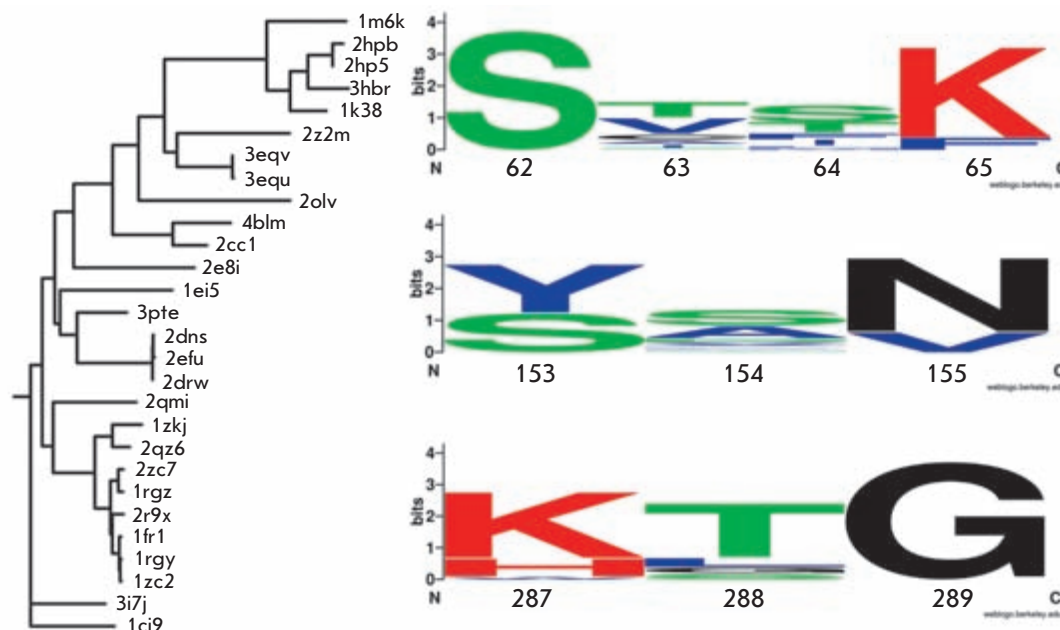
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Биоинформатический анализ семейства белков, гомологичных D-аминопептидазе

Для сбора и анализа данных по семейству пенициллин-связывающих белков, включающего D-аминопептидазы, D-амидазы аминокислот, щелочные D-пептидазы и бета-лактамазы, был проведен поиск гомологов D-аминопептидазы из *Ochrobactrum anthropi* по первичной и третичной структуре в банках данных белковых последовательностей UniProt и белковых структур PDB. Полученная в результате выборка из 734 гомологов по первичной структуре и 24 гомологов по третичной структуре была профильтрована, и наиболее информативные последовательности отобраны для проведения множественного выравнивания по первичной и третичной структуре. Выравнивание трехмерных структур показало, что область активного центра D-аминопептидазы обладает достоверным сходством с D-амидазами аминокислот, щелочными D-пептидазами и бета-лактамазами как на уровне аминокислотной последовательности, так и на уровне пространственной организации (рис. 1).

Определение консервативных позиций в активных центрах пенициллин-связывающих белков было проведено с использованием программного обеспечения ZEBRA, ранее разработанного в нашей лаборатории. Следующие позиции в структуре D-аминопептидазы определены как консервативные: 287H, 153Y, 155N, 289G, 273G,

Рис. 1. Филогенетическое дерево семейства пенициллин-связывающих белков и мотивы первичной структуры, содержащие важные для каталитического механизма аминокислотные остатки Ser62 и Lys65 (SXHK), Tyr153 ([YS] XN) и His287 ([KN] XG). Обозначение представителей семейства пенициллин-связывающих белков на филогенетическом дереве соответствует номерам соответствующих записей в банке данных PDB.



293G, 270Y, 65K, 224G, 62S, 68T, 294W, 64S, 151Y, 228I, 60I, 288G (нумерация по структуре 1EI5, остатки приведены в порядке уменьшения степени консервативности); они локализованы в общем для семейства пенициллин-связывающих белков каталитическом домене, который имеет альфа-бета организацию и определяется как «трех-

слойный сандвич» по структурной классификации CATH [19] (рис. 2). Учитывая тот факт, что степень консервативности аминокислотного остатка в структуре фермента свидетельствует о давлении естественного отбора на эту позицию и говорит о ее структурной или функциональной значимости [20], можно предположить участие обнаруженных аминокислот в механизме действия D-аминопептидазы (рис. 2).

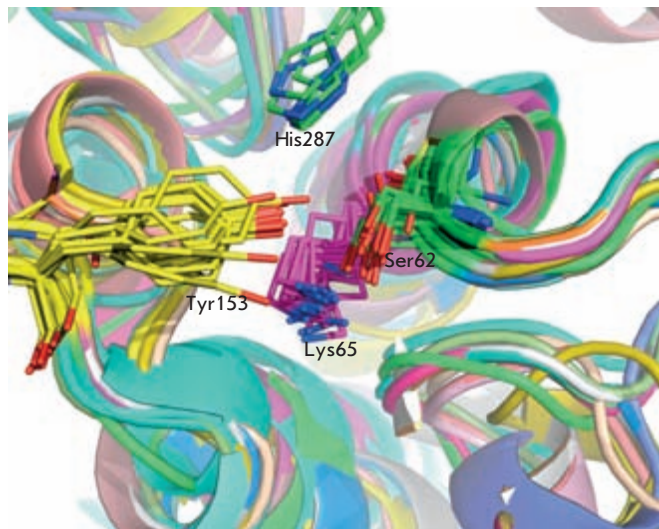


Рис. 2. Фрагмент трехмерного выравнивания представителей семейства пенициллин-связывающих белков – структурных гомологов D-аминопептидазы из *Ochrobactrum anthropi*. Показаны остатки активного центра, участвующие в каталитическом механизме (Ser62, Lys65, Tyr153, His287) и являющиеся консервативными в D-аминопептидазе и других представителях семейства.

### Анализ структуры D-аминопептидазы

Анализ структуры D-аминопептидазы (1EI5) выявляет пару близко расположенных остатков Tyr153 и Lys65 в окружении каталитического остатка Ser62 с примерно равным расстоянием от нуклеофильного атома Oγ серина. Три указанных остатка образуют почти равносторонний треугольник в пространстве активного центра (рис. 3). Такое расположение остатков обеспечивает организацию каталитической триады, когда атом водорода гидроксильной группы серина направлен внутрь треугольника и поделен между всеми тремя остатками. Особенность организации каталитической триады обусловлена весьма необычной ролью аминокислотного остатка Lys65, способного акцептировать протон в нейтральной и слабощелочной среде и обеспечивать высокую реакционную способность остатка Ser62 при образовании промежуточного ацилфермента.

Значительно более низкое значение pKa остатка Lys65, равное 7.8, по сравнению с обычными значениями pK остатков лизина в белках 10–11 было обнаружено при расчете ионизационных свойств аминокислотных остатков активного центра D-аминопептидазы QSAR-методом PROPKA [21]. Следует отметить также довольно высокое значение pKa, найденное для остатка Tyr153, равное 11.85.

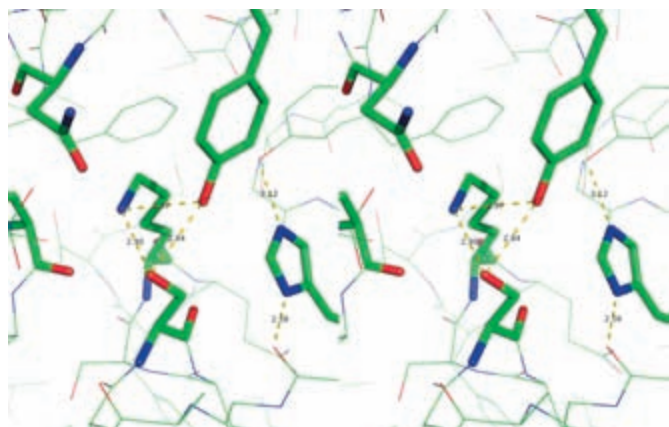


Рис. 3. Стереобразное изображение активного центра D-аминопептидазы, показывающее структурную организацию каталитической триады. Выделены остатки S62, K65, Y153, N155, H287 и D225.

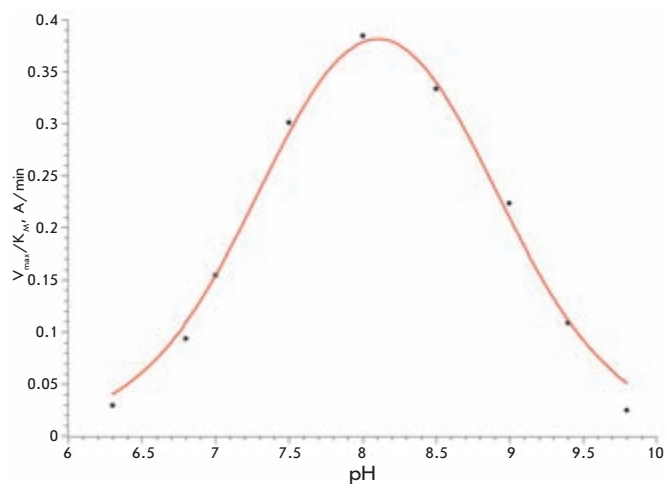


Рис. 4. pH-профиль каталитической активности D-аминопептидазы. Расчетная кривая построена по уравнению  $v = v_0 / (1 + [H^+]/K_1 + K_2/[H^+])$  со значениями  $v_0$ ,  $pK_1$  и  $pK_2$ , равными 0.53, 7.4 и 8.8 соответственно.

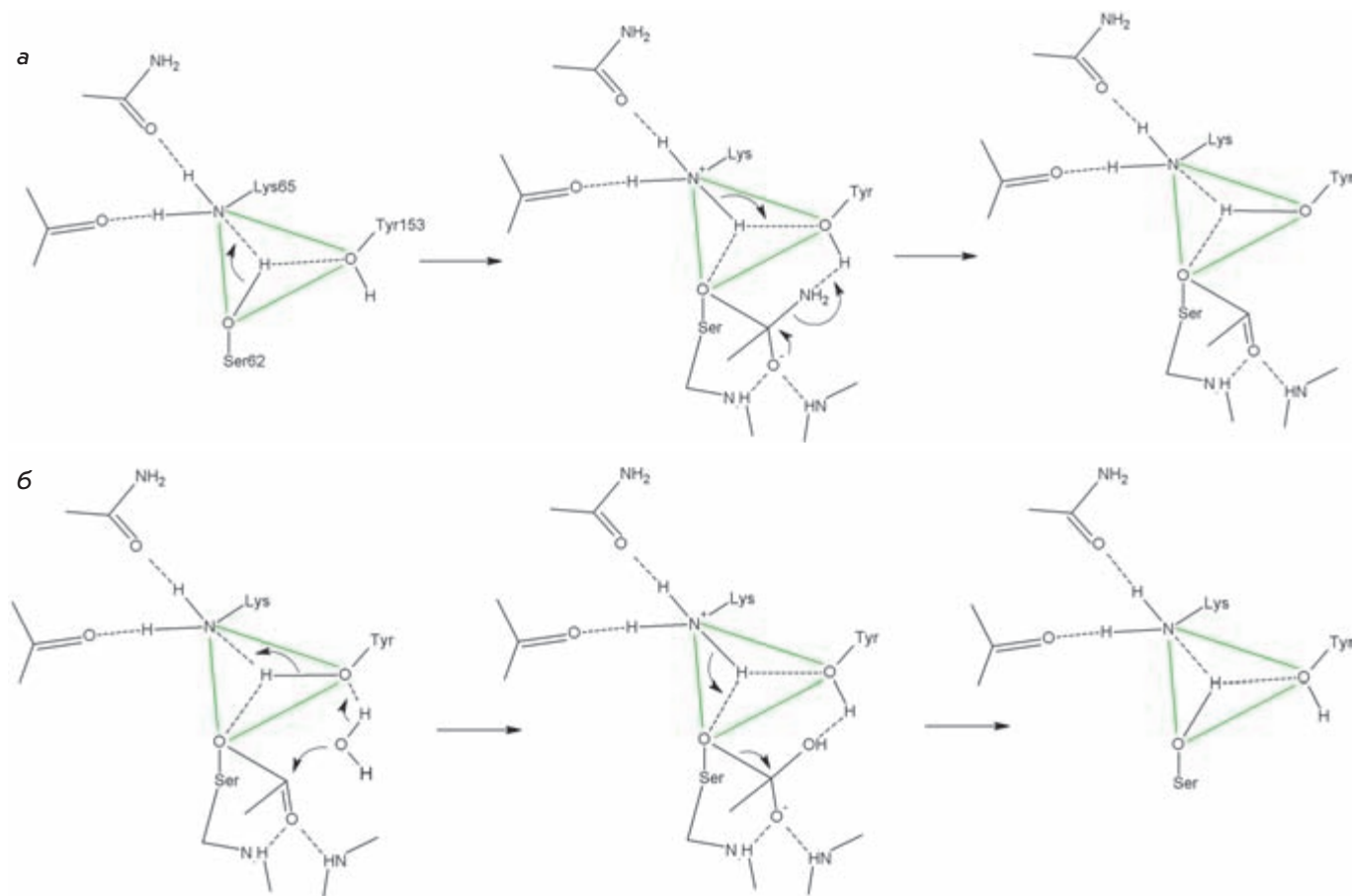


Рис. 5. Схематическое изображение стадий ацилирования (а) и деацилирования (б) остатка Ser62 в механизме действия D-аминопептидазы. Последовательно показано: а – организация каталитической триады и исходное состояние свободного фермента, связывание субстрата и нуклеофильная атака остатком Ser62 молекулы субстрата с образованием первого тетраэдрического интермедиата, отщепление уходящей группы и образование ацилфермента; б – связывание нуклеофила (молекулы воды), активация и нуклеофильная атака с образованием второго тетраэдрического интермедиата, отщепление ацильной части субстрата и регенерация свободного фермента.



### Экспериментальное определение рН-профиля активности D-аминопептидазы

Экспериментальные данные хорошо согласуются с результатами молекулярного моделирования и предполагаемой ролью остатка Lys65 в функционировании каталитической триады. Исследование показало, что рН-профиль каталитической активности D-аминопептидазы имеет колоколообразную форму (рис. 4). Аминокислотный остаток фермента с рКа 7.4 на основании результатов молекулярного моделирования был определен как Lys65.

### Предполагаемый механизм действия D-аминопептидазы

Как и в случае других сериновых гидролаз, реакция, катализируемая D-аминопептидазой, протекает по трехстадийной схеме через стадии образования промежуточного ковалентного ацилфермента и последующего его гидролиза (или переноса ацильной части на внешний нуклеофил). Низкое значение рКа остатка Lys65 обуславливает следующую роль этого остатка в механизме реакций, катализируемых D-аминопептидазой (рис. 5).

Незаряженный в условиях рН-оптимума ферментативной реакции остаток Lys65 выполняет функцию общего основания при атаке Оγ атома Ser62 по карбонильной группе субстрата и принимает протон с атакующей ОН-группы при образовании тетраэдрического интермедиата на стадии ацилирования.

С разрушением тетраэдрического интермедиата и образованием ацилфермента уходящая группа принимает близко расположенный и образующий с ней водородную связь протон гидроксильной группы остатка Tyr153, значение рКа которого понижено за счет близко расположенного положительного заряда остатка Lys65. Одновременно с этим получившийся нестабилизированный оксианион, будучи более сильным основанием, депротонирует остаток лизина.

Процесс деацилирования каталитического остатка серина фермента протекает посредством активации молекулы воды (или другого внешнего нуклеофила) при совместном действии двух оснований Lys65 и Tyr153 и передаче протона по цепочке от нуклеофила к остатку Tyr153, а от остатка Tyr153 к Lys65 – с образованием второго тетраэдрического интермедиата.

Одновременно с разрушением второго тетраэдрического интермедиата и последующим отрывом ацильной части субстрата (выделением второго продукта реакции) образующийся окси-анион Ser62 депротонирует остаток Lys65, и фермент приходит к первоначальному состоянию.

### ВЫВОДЫ

Проведен биоинформатический и филогенетический анализ семейства пенициллин-связывающих белков, включающего D-аминопептидазы, и определены консервативные аминокислотные остатки. Три из них: каталитический Ser62, Lys65 и Tyr153 – образуют необычную триаду переноса протона, обеспечивающую активацию обобщенного нуклеофила активного центра фермента в процессе катализа. При помощи молекулярного моделирования показано, что консервативный остаток Lys65 имеет необычно низкое значение рКа, которое подтверждено также экспериментальным исследованием рН-профиля каталитической активности D-аминопептидазы. Полученные данные позволили установить роль остатка Lys65 в механизме действия D-аминопептидазы как общего основания, ответственного за передачу протона от каталитического остатка Ser62 к остатку Tyr153 и обратно на стадиях образования и расщепления промежуточного ацилфермента. ●

*Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований и Японским обществом продвижения науки (грант № 09-08-92104-ЯФ).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Asano Y, Nakazawa A., Kato Y, Kondo K. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 14233–14239.
- Bompard-Gilles C., Remaut H., Villeret V., et al. // Structure. 2000. V. 8. P. 971–980.
- Asano Y, Kato Y, Yamada A., Kondo K. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 2316–2328.
- Okazaki S., Suzuki A., Komeda H., et al. // J. Mol. Biol. 2007. V. 368. P. 79–91.
- Massova I., Kollman P. // J. Comput. Chem. 2002. V. 23. P. 1559–1576.
- Ke Y, Lin T. // Biophys. Chem. 2005. V. 114. P. 103–113.
- Gherman B., Goldberg S., Cornish V., Friesner R. // J. Am. Chem. Soc. 2004. V. 126. P. 7652–7664.
- SciDAVis: a free application for scientific data analysis and visualization. <http://scidavis.sourceforge.net/>
- Altschul S., Madden T., Schäffer A., et al. // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402.
- Notredame C., Higgins D., Heringa J. // J. Mol. Biol. 2000. V. 302. P. 205–217.
- Kato K., Asimenos G., Toh H. // Methods Mol. Biol. 2009. V. 537. P. 39–64.
- Do C., Mahabhashyam M., Brudno M., Batzoglou S. // Genome Res. 2005. V. 15. P. 330–340.
- Krissinel E., Henrick K. // Acta Cryst. 2004. V. D60. P. 2256–2268.
- Konagurthu A., Whisstock J., Stuckey P., Lesk A. // Proteins. 2006. V. 64. P. 559–574.
- Felsenstein J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, USA.
- Waterhouse A., Procter J., Martin D., Clamp M., Barton G. // Bioinformatics. 2009. V. 25. P. 1189–1191.
- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.0r1, Schrödinger, LLC. <http://www.pymol.org/>
- Crooks G., Hon G., Chandonia J., Brenner S. // Genome Research. 2004. V. 14. P. 1188–1190.
- Koonin E., Galperin M. Sequence - Evolution - Function: Computational Approaches in Comparative Genomics. Kluwer Academic Publishers, 2003. P. 461.
- Pearl F., Bennett C., Bray J., et al. // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. P. 452–455.
- Li H., Robertson A., Jensen J. // Proteins. 2005. V. 61. P. 704–721.