

УДК 577.152.22, 577.112.083, 577.151.44, 577.151.45

Выделение и биохимическая характеристика рекомбинантной транскетолазы *Mycobacterium tuberculosis*

Т. А. Щербакова¹, С. М. Балдин¹, М. С. Шумков², И. В. Гущина³, Д. К. Нилов¹, В. К. Швядас^{1,3*}¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, 119991 Россия²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, 119071 Россия³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, 119991 Россия

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

Поступила в редакцию 30.03.2022

Принята к печати 25.05.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11713

РЕФЕРАТ Фермент пентозофосфатного пути транскетолаза играет важную роль в жизнедеятельности микобактерий. С использованием плазмиды, несущей ген транскетолазы *Mycobacterium tuberculosis* с дополнительным гистидиновым тагом, проведены выделение и очистка препарата рекомбинантной бактериальной транскетолазы, определены условия получения апоформы белка. Определены значения константы Михаэлиса для кофактора тиаминдифосфата в присутствии ионов магния и кальция. Обнаружено, что сродство транскетолазы микобактерий к тиаминдифосфату на три порядка ниже, чем у фермента человека. Анализ структурной организации активных центров гомологичных ферментов показал, что данное отличие обусловлено заменой остатков лизина на менее полярные аминокислотные остатки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА транскетолаза, тиаминдифосфат, ксилулозо-5-фосфат, рибозо-5-фосфат, микобактерии.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ТК – транскетолаза; hTK – транскетолаза человека; mbTK – транскетолаза микобактерий; yTK – транскетолаза дрожжей; ТДФ – тиаминдифосфат; К5Ф – ксилулозо-5-фосфат; Р5Ф – рибозо-5-фосфат.

ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез является распространенным инфекционным заболеванием, вызываемым микобактериями *Mycobacterium tuberculosis*. Несмотря на многовековую борьбу с туберкулезом, до сих пор не существует лекарственных средств, позволяющих быстро и безопасно бороться с этим инфекционным заболеванием. В этой связи актуален поиск новых белковых мишеней, важных для жизнедеятельности микобактерий, и разработка соответствующих селективных ингибиторов. Геномный анализ штамма H37Rv [1] позволил определить ключевые биосинтетические процессы, среди которых можно отметить пентозофосфатный путь метаболизма углеводов.

Транскетолаза (ТК; [КФ 2.2.1.1]) – важный фермент пентозофосфатного пути, участвующий в расщеплении кетозы (субстрат-донор) и последующем

переносе двухуглеродного фрагмента на альдозу (субстрат-акцептор). Фермент обнаружен практически во всех тканях животных и растений, а также во многих микроорганизмах [2–4]. Есть основания полагать, что ТК *M. tuberculosis* (mbTK) участвует в синтезе углеводов, необходимых для строения бактериальной клеточной стенки [5]. Однако биохимические свойства mbTK пока мало изучены, что затрудняет эффективный поиск ингибиторов фермента. Опубликованы предварительные данные о субстратной специфичности mbTK, а также установлена одна кристаллическая структура (PDB ID 3rim) [6]. Целью данной работы были получение очищенного препарата и биохимическая характеристика рекомбинантной mbTK, изучение связывания фермента с кофактором тиаминдифосфатом (ТДФ), а также субстратами – ксилулозо-5-фосфатом (К5Ф) и рибозо-5-фосфатом (Р5Ф).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Рекомбинантную mbTK получали с использованием *Escherichia coli* штамм BL21(DE3). Трансформацию клеток осуществляли с помощью плазмиды pET-19b, несущей ген *Rv1449c* с гистидиновым тегом, а также ген устойчивости к ампициллину. Трансформированный штамм выращивали в среде LB в течение 12 ч, после чего переносили в качалочную колбу со средой, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), и инкубировали в течение 6–7 ч (180 об/мин, 37°C). Экспрессию mbTK начинали, снижая температуру до 15°C, добавляя MgCl₂ или CaCl₂ (2 мМ), ТДФ (2 мМ), изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (0.2 мМ) и глицерин (2% по объему), и продолжали экспрессию в течение 24 ч. Клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин (4000 g, 4°C), ресуспендировали в фосфатном буфере (50 мМ NaH₂PO₄, pH 8.0, 0.3 M NaCl), добавляли лизоцим (1 мг/мл) и инкубировали в течение 30 мин. Клетки разрушали ультразвуком при 0°C. Полученный лизат центрифугировали в течение 30 мин (12000 g, 4°C). Выделение белка mbTK, содержащего декагистидиновый фрагмент, проводили на колонках Protino Ni-TED 1000 (Macherey-Nagel) согласно протоколу производителя. Чистоту полученного препарата mbTK анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле [7].

Стандартное измерение активности mbTK проводили по сопряженной реакции восстановления NAD⁺, катализируемой глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой из мышц кролика [8]. Система для измерения активности при pH 7.6 и 25°C содержала: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (3 Е), глицил-глицин (50 мМ), дитиотреитол (3.2 мМ), арсенат натрия (10 мМ), хлорид магния или кальция (2.5 мМ), ТДФ (200 мкМ), K5Ф (500 мкМ), P5Ф (2800 мкМ), NAD⁺ (370 мкМ). Реакцию начинали добавлением раствора mbTK. Скорость реакции регистрировали по увеличению оптической плотности раствора при 340 нм в течение 3–5 мин. Измерения проводили с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1800.

Удаление кофакторов для получения апоформы mbTK проводили по методике, изложенной в работе [9]. Для этого к раствору холофермента mbTK (0.2 мг/мл) в 10 мМ глицил-глициновом буфере, pH 7.4, добавляли насыщенный раствор сульфата аммония, pH 3.5, в соотношении 2 : 3, инкубировали во льду в течение 5 мин, затем центрифугировали в течение 15 мин (12000 g, 4°C). Осажденный белок растворяли в 50 мМ глицил-глициновом буфере, pH 7.4. Для определения константы связывания ТДФ апоформу mbTK инкубировали в 50 мМ глицил-глициновом буфере, pH 7.6, в присутствии

2.5 мМ двухвалентного катиона (Mg²⁺ или Ca²⁺) при различной концентрации ТДФ (0–200 мкМ) в течение 45–60 мин при 25°C. Для стабилизации белка в пробу добавляли бычий сывороточный альбумин (1 мг/мл). Затем в кювету вносили остальные компоненты, необходимые для измерения активности mbTK, реакцию начинали добавлением смеси субстратов. Значение константы Михаэлиса рассчитывали с использованием зависимости скорости реакции от концентрации кофактора, построенной в координатах Лайнуивера–Берка.

Константы связывания субстратов определяли с использованием стандартной методики, варьируя концентрацию исследуемого субстрата в пределах 0–100 мкМ для K5Ф и 0–215 мкМ для P5Ф. Концентрация второго субстрата при этом была постоянной и составляла 320 мкМ. Значение констант Михаэлиса рассчитывали построением зависимости скорости реакции от концентрации исследуемого субстрата в координатах Лайнуивера–Берка.

Для сравнения активных центров ТК разных организмов использовали кристаллическую структуру mbTK [6], структуру ТК дрожжей (yTK) [10] и человека (hTK) [11]. Последовательности ТК выравнивали в программе Matt 1.0 [12]. Визуализацию кристаллических структур осуществляли с помощью VMD 1.9.2 [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантный белок для изучения биохимических свойств mbTK получен путем трансформации штамма *E. coli* BL21(DE3) плазмидой, несущей ген *Rv1449c*. Обнаружено, что значительная часть (около 50%) получаемого белка находится в апоформе, которая быстро теряет активность в процессе выделения и очистки. Добавление кофактора ТДФ во время экспрессии позволило увеличить содержание холоформы до 75%, что привело к повышению удельной активности получаемого рекомбинантного препарата mbTK и позволило выделить необходимое количество активного фермента. Следует заметить, что в активном центре ферментов этого семейства содержится ион двухвалентного металла: hTK содержит магний, а yTK – кальций (замена иона металла возможна при реконструкции холоформы ТК из апоформы) [9, 14–16]. Единственная кристаллическая структура mbTK содержит Mg²⁺ [6], однако предпочтительный тип иона металла при физиологических условиях еще предстоит определить. В процессе оптимизации условий получения рекомбинантной mbTK нами установлено, что выбор иона металла (Mg²⁺ или Ca²⁺) при культивировании и экспрессии не оказывает влияния на конечный выход активного фермента.

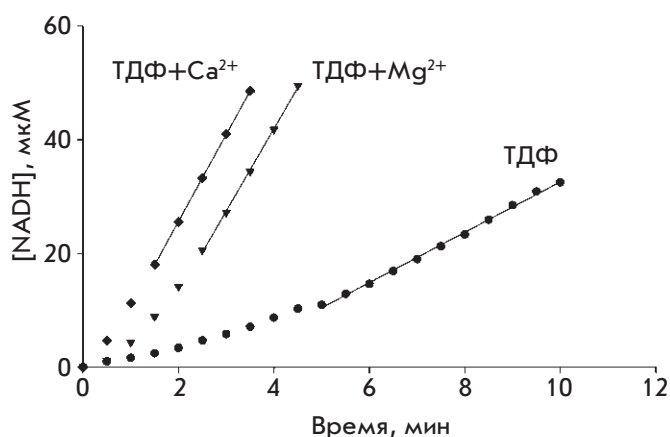


Рис. 1. Зависимость восстановления ферментативной активности от времени при добавлении ТДФ (200 мкМ) и ионов Mg^{2+} или Ca^{2+} (2.5 мМ) к апоформе mbTK

Таблица 1. Восстановление ферментативной активности при активации апоформы mbTK в присутствии и в отсутствие в среде ионов металлов и ТДФ

Mg^{2+}/Ca^{2+} (2.5 мМ)	ТДФ (200 мкМ)	Остаточная активность, %
–	–	5
+	–	5
–	+	30
+	+	100

Для исследования связывания mbTK с кофактором ТДФ было необходимо получить апоформу белка. Известны различные методы удаления кофакторов: диализ, хроматография, осаждение сульфатом аммония. уTK утрачивает кофакторы при диализе в слабо щелочной среде [17], тогда как кофакторы hTK могут быть удалены лишь при осаждении сульфатом аммония в кислой среде [9]. В случае mbTK кофактор смогли удалить при осаждении сульфатом аммония в кислой среде (pH 3.5). Для активации апофермента и полноценного функционирования mbTK необходимо одновременное присутствие в активном центре иона металла и молекулы ТДФ (см. табл. 1). Следует отметить, что скорость активации апофермента и образования холофермента в присутствии Ca^{2+} выше, чем в присутствии Mg^{2+} (рис. 1). Кроме того, реконструкция холоформы mbTK при добавлении кофакторов происходит гораздо эффективнее при 25°C (по сравнению с 0°C).

При определении значения константы Михаэлиса для ТДФ апоформу mbTK предварительно инкубировали в растворе, содержащем двухвалентный ион металла и различные концентрации кофактора. Значение K_m в присутствии Mg^{2+} составило 57 мкМ,

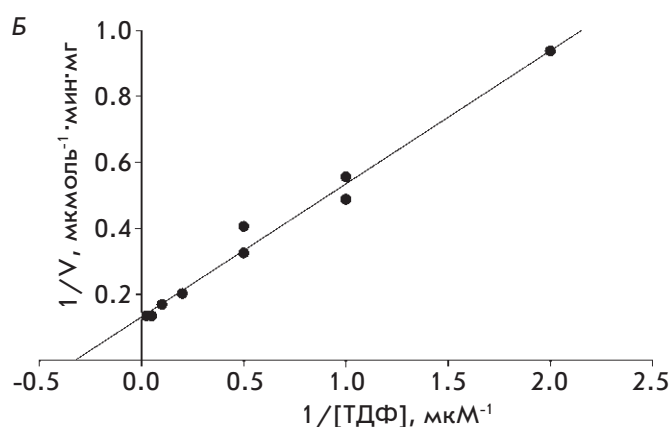
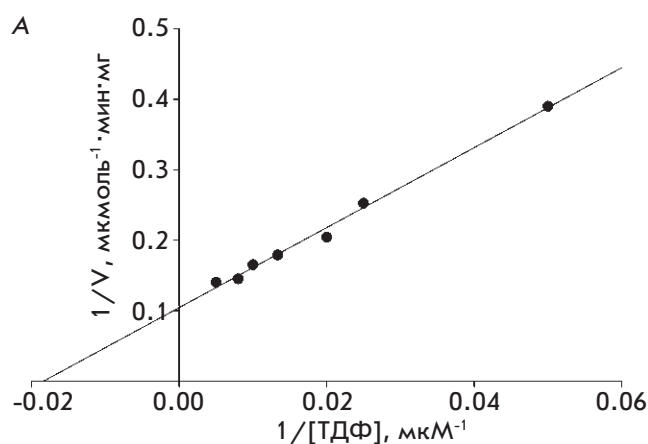


Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции, катализируемой mbTK, от концентрации ТДФ и определение значения константы Михаэлиса в присутствии Mg^{2+} (А) и Ca^{2+} (Б)

Таблица 2. Значения K_m для ТДФ в реакциях, катализируемых ТК из различных организмов, в присутствии Mg^{2+} и Ca^{2+}

Фермент	$K_m (Mg^{2+})$, мкМ	$K_m (Ca^{2+})$, мкМ
hTK	0.074 [9]	не определено
yTK	0.22–4.4 [18]	0.032–0.250 [4, 14]
mbTK	57	3

в присутствии Ca^{2+} – 3 мкМ (рис. 2). Необходимо отметить, что сродство mbTK к кофактору существенно ниже, чем у гомологичных эукариотических ферментов (табл. 2). Так, у фермента дрожжей yTK значение K_m для ТДФ на порядок, а у фермента человека hTK – на три порядка лучше. Чтобы выяснить, какие взаимодействия в активном центре

Таблица 3. Сродство к субстратам К5Ф и Р5Ф в реакциях, катализируемых ТК из различных организмов, в присутствии Mg^{2+}

Фермент	K_m (К5Ф), мкМ	K_m (Р5Ф), мкМ
hTK	11 [9]	63 [9]
yTK	71 [9]	400 [20]
mbTK	30	134

столь существенно влияют на эффективность связывания кофактора, проведен анализ структурной организации участков связывания кофактора в кристаллических структурах mbTK (3rim), yTK (1ngs) и hTK (3mos).

В ферменте hTK человека существенный вклад в энергию связывания вносят остатки Lys75 и Lys244 за счет прямого электростатического взаимодействия с пирофосфатной группой ТДФ. Остатку Lys75 в yTK соответствует Asn67, который взаимодействует с пирофосфатной группой опосредованно (через молекулы воды), а в mbTK – Ala83, который не контактирует с ТДФ (рис. 3). Полярному остатку Lys244 соответствует гидрофобный остаток Ile250 в yTK и Ile269 в mbTK. Остаток Ile416 в yTK образует более плотный гидрофобный контакт с тиазольным фрагментом молекулы ТДФ по сравнению с Val439 в mbTK (рис. 3). Можно предположить, что указанные замены вносят основной вклад в снижение сродства к ТДФ в ряду hTK > yTK > mbTK. В то же время группа других вариабельных остатков Ser40/Ala33/Thr48, Gly154/Gly156/Ser176 и Glu157/Cys159/Asp179 (hTK/yTK/mbTK) прямо или опосредованно образует две водородные связи с пирофосфатной группой ТДФ во всех трех белках.

Свойства участков связывания субстратов в ферментах из разных источников различаются меньше, чем свойства участков связывания кофактора. Этот вывод подтверждают определенные нами значения K_m двух субстратов – для К5Ф и Р5Ф в реакциях, катализируемых mbTK в присутствии магния. Для этого исследовали зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации одного из субстратов при избытке второго субстрата, при этом содержание второго субстрата не превышало максимальной концентрации варьируемого компонента более чем в 3.5 раза. Данное ограничение накладывали, принимая во внимание возможную конкуренцию субстратов за связывание в активном центре, обнаруженное у yTK [19]. Найденные значения K_m , составившие 30 мкМ для К5Ф и 134 мкМ для Р5Ф, сопоставимы со зна-

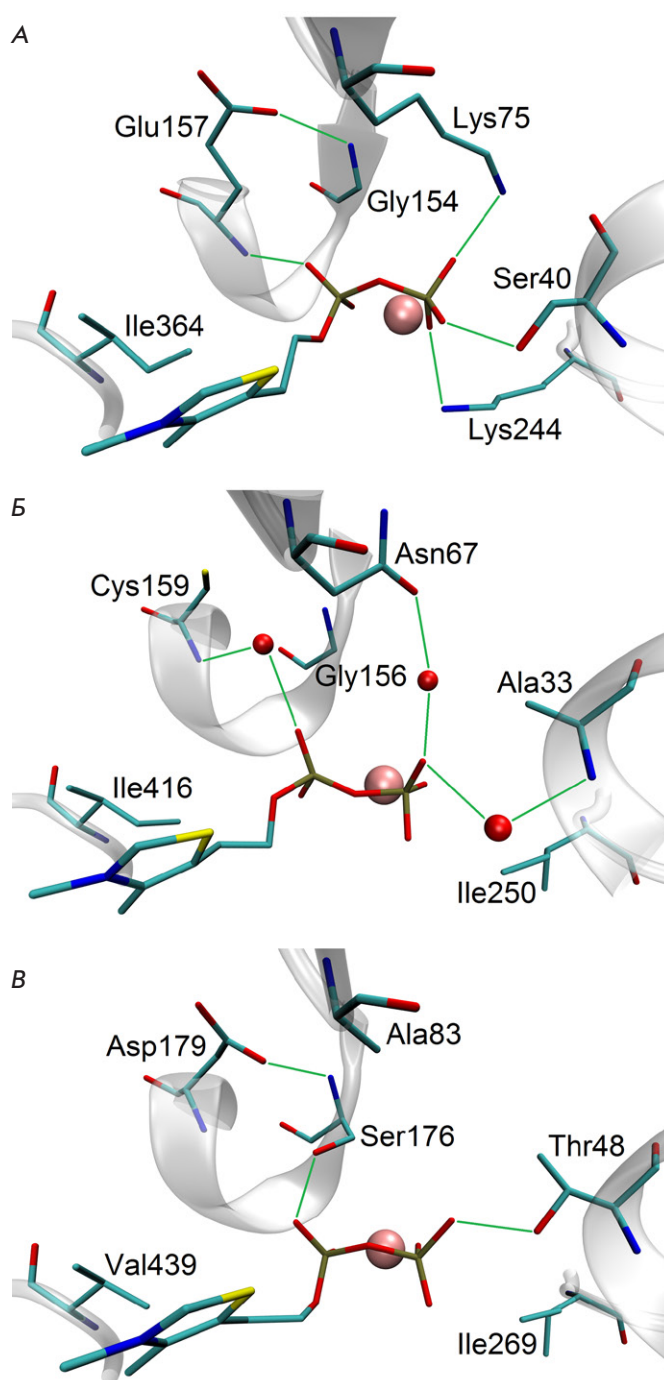


Рис. 3. Взаимодействия кофактора ТДФ с вариабельными остатками в активном центре гомологичных ферментов hTK (А), yTK (Б) и mbTK (В). Пиримидиновая часть молекулы ТДФ не показана. Ион двухвалентного металла окрашен розовым цветом. Зеленым цветом обозначены водородные связи

чениями K_m для этих субстратов в реакциях, катализируемых hТК и уТК (табл. 3), что согласуется с выводами о консервативности участка связывания.

ВЫВОДЫ

С использованием плазмиды рЕТ-19b, несущей ген *Rv1449c*, получены препараты холо- и апоформ микобактериальной транскетолазы mbТК, проведены выделение и очистка рекомбинантного фермента. Показано, что микобактериальная транскетолаза mbТК по своим биохимическим свойствам существенно отличается как от гомологичного фермента человека hТК, так и от дрожжевого фермента уТК, что связано с заменой остатков лизина в активном

центре на менее полярные аминокислотные остатки. Обнаружено, что у mbТК сродство к кофактору почти на три порядка хуже по сравнению с hТК. Следовательно, низкомолекулярным соединениям проще конкурировать за участок связывания ТДФ в активном центре ТК микобактерий. Данный фактор обуславливает возможность разработки нового класса противобактериальных ингибиторов, селективно подавляющих активность mbТК и не оказывающих существенного действия на hТК. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда
(грант № 15-14-00069-П).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E. 3rd, et al. // *Nature*. 1998. V. 393. P. 537–544.
2. Schenk G., Duggleby R.G., Nixon P.F. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1998. V. 30. P. 1297–1318.
3. Севостьянова И.А., Селиванов В.А., Юршев В.А., Соловьева О.Н., Забродская С.В., Кочетов Г.А. // *Биохимия*. 2009. Т. 74. С. 972–976.
4. Kochetov G.A., Solovjeva O.N. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1844. P. 1608–1618.
5. Wolucka B.A. // *FEBS J.* 2008. V. 275. P. 2691–2711.
6. Fullam E., Pojer F., Bergfors T., Jones T.A., Cole S.T. // *Open Biol.* 2012. V. 2. P. 110026.
7. Laemmly U.K., Favre M. // *J. Mol. Biol.* 1973. V. 80. P. 575–599.
8. Kochetov G.A. // *Methods Enzymol.* 1982. V. 90. P. 209–223.
9. Мешалкина Л.Е., Соловьева О.Н., Хомак Ю.А., Друца В.Л., Кочетов Г.А. // *Биохимия*. 2010. Т. 75. С. 992–1000.
10. Nilsson U., Meshalkina L., Lindqvist Y., Schneider G. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 1864–1869.
11. Mitschke L., Parthier C., Schröder-Tittmann K., Coy J., Lüdtke S., Tittmann K. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 31559–31570.
12. Menke M., Berger B., Cowen L. // *PLoS Comput. Biol.* 2008. V. 4. P. e10.
13. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // *J. Mol. Graph.* 1996. V. 14. P. 33–38.
14. Kochetov G.A., Philippov P.P. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1970. V. 38. P. 930–933.
15. Datta A.G., Racker E. // *J. Biol. Chem.* 1961. V. 236. P. 617–623.
16. Кочетов Г.А. // *Биохимия*. 1986. Т. 51. С. 2010–2029.
17. Sprenger G.A., Schörken U., Sprenger G., Sahm H. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 230. P. 525–532.
18. Esakova O.A., Meshalkina L.E., Golbik R., Hübner G., Kochetov G.A. // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271. P. 4189–4194.
19. Соловьева О.Н., Мешалкина Л.Е., Ковина М.В., Селиванов В.А., Быкова И.А., Кочетов Г.А. // *Биохимия*. 2000. Т. 65. С. 1421–1424.
20. Kochetov G.A., Sevostyanova I.A. // *IUBMB Life*. 2010. V. 62. P. 797–802.