



УДК 577.152.121*2.012.6:577.322.63

© 1990 г.

В. С. Ламзин, А. Е. Алешин*, Б. О. Попов,
Э. Г. Арутюнян*

NAD-ЗАВИСИМАЯ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА МЕТИЛОТРОФНЫХ
БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS* sp. 101

II.* ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ФЕРМЕНТА
ПРИ РАЗРЕШЕНИИ 3,0 Å

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва;

* Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова АН СССР, Москва

С использованием трех изоморфных тяжелоатомных производных проведено рентгеноструктурное исследование кристаллов холоформы NAD-зависимой бактериальной формиатдегидрогеназы (тройной комплекс фермент—NAD—азид) с разрешением 3,0 Å. Показано, что субъединицы фермента состоят из двух доменов — каталитического и коферментсвязывающего, в полости между которыми находится активный центр и место связывания молекулы NAD. Определен ход полипептидной цепи, в которой локализовано 393 C α -атома. Определены элементы вторичной структуры формиатдегидрогеназы. Установлено, что NAD-связывающая область имеет характерную для NAD-зависимых дегидрогеназ структуру и состоит из элементов укладки по Россману.

Для выяснения молекулярного механизма действия NAD-зависимой формиатдегидрогеназы помимо биохимических и физико-химических характеристик фермента требуется знание его пространственной структуры.

Ранее [2] нами были получены кристаллы холоформы NAD-зависимой формиатдегидрогеназы метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 — тройного комплекса фермент—NAD—азид. В связи с особенностью электронного строения аниона азид-иона, его высоким сродством к активному центру фермента и близостью геометрических характеристик анионов азид-иона и формиата тройной комплекс фермент—NAD—азид рассматривается нами как гипотетический стабильный аналог переходного состояния ферментативного процесса [3]. Дифракционное поле кристаллов простирается до разрешения не менее 2,3 Å [2]. С использованием фаз, рассчитанных по четырем тяжелоатомным производным, был построен синтез электронной плотности кристаллов белка с разрешением 5,0 Å, интерпретация которого позволила установить приблизительные форму и размеры субъединиц молекулы формиатдегидрогеназы, их взаимное расположение в кристаллографической ячейке и локализовать молекулярную ось симметрии второго порядка [4].

Цель настоящего исследования — рентгеноструктурный анализ NAD-зависимой формиатдегидрогеназы метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 с разрешением 3,0 Å и определение атомной модели молекулы белка. В данной статье приведена предварительная часть этого исследования, включающая описание хода полипептидной цепи и элементов вторичной структуры формиатдегидрогеназы.

На основании рентгеноструктурного анализа низкого разрешения нами была скорректирована граница молекулы формиатдегидрогеназы в кристаллографической ячейке. Из четырех тяжелоатомных производных, использованных нами ранее [2], для получения синтеза электронной плотности с разрешением 3,0 Å оказались пригодными только три (одна с

* Сообщение I см. [1]. Сокращения: FDH — формиатдегидрогеназа, LDH — лактатдегидрогеназа, MDH — малатдегидрогеназа, LADH — алкогольдегидрогеназа печени лошади, PCMB — *para*-хлормеркурийбензоат.

Результаты уточнения параметров тяжелоатомных производных *

Производные	Z	$\langle E \rangle$	$\langle f_H \rangle$	$R_c, \%$	Разрешение, Å
Нативный белок					20–3,0
Уранилацетат	10	1,10	1,45	66	20–3,0
PCMB-1	2	1,06	1,50	64	20–3,0
PCMB-2	4	1,00	1,80	58	20–3,5

* Z — количество мест связывания на молекулу формиадегидрогеназы,
 $\langle E \rangle = \sqrt{\sum |F_{PH} - D_{PH}|^2 / N}$, $\langle f_H \rangle = \sum F_H / N$, $R_c = \sum |F_{PH} - D_{PH}| / \sum |D_{PH} - D_P|$, D_{PH} , D_P — экспериментальные значения структурных амплитуд для производного и нативного кристаллов, F_{PH} , F_H — расчетные значения структурных амплитуд для производного и тяжелых атомов, N — количество отражений.

уранилацетатом и две с *пара*-хлормеркурийбензоатом). Результаты последнего цикла уточнения представлены в табл. 1. Распределение электронной плотности, рассчитанное с применением данных по этим производным, подчинялось действию некристаллографической молекулярной оси симметрии второго порядка, что было использовано при уточнении фаз структурных амплитуд белка. Вместе с тем это дало возможность провести интерпретацию карт электронной плотности лишь в пределах одной субъединицы, а положения атомов другой получить путем разномножения осью второго порядка. Положение молекулярной оси симметрии было выбрано таким образом, чтобы разница в значениях электронной плотности в симметрически связанных точках была минимальной.

Качество карт электронной плотности позволило определить ход полипептидной цепи формиадегидрогеназы без использования данных о первичной структуре белка. Минимальный уровень электронной плотности был подобран таким образом, чтобы общий ее объем приблизительно соответствовал объему молекулы в ячейке. Оказалось, что в большинстве случаев максимумы, соответствующие основной цепи, не имеют разрывов, а максимумы электронной плотности боковых групп не перекрываются.

В субъединице формиадегидрогеназы было локализовано около 390 C α -атомов. Последующее встраивание аминокислотной последовательности белка в его пространственную структуру подтвердило правильность определения хода полипептидной цепи фермента (рис. 1).

Субъединицы упакованы в молекулу достаточно плотно, практически без видимых между ними зазоров или полостей. Полипептидная цепь каждой из субъединиц организована в глобулярную двухдоменную структуру. В соответствии с общими принципами структурной организации NAD-зависимых дегидрогеназ [5] их домены имеют специфическое функциональное значение. Так называемый коферментсвязывающий домен ответствен за узнавание и связывание молекулы NAD в продуктивной конформации и имеет эволюционно-консервативную структуру. Каталитический домен в дегидрогеназах, напротив, специфичен для каждого белка и содержит каталитически важные аминокислотные остатки, ориентированные в активный центр. Из карты межатомных расстояний субъединицы формиадегидрогеназы (рис. 2), иллюстрирующей вторичную структуру фермента и наличие двух доменов, видно, что коферментсвязывающий домен локализован в середине полипептидной цепи (аминокислотные остатки со 147-го по 333-й), а каталитический домен включает два фрагмента полипептидной цепи (остатки с 1-го по 146-й и с 334-го по 393-й).

Коферментсвязывающий домен по своим размерам несколько меньше каталитического и выражен на картах электронной плотности значительно четче, вероятно, вследствие меньшей подвижности. Каталитические домены молекулы фермента расположены на периферии белковой глобулы и не связаны между собой, а две субъединицы контактируют через коферментсвязывающие домены, которые расположены вблизи оси симметрии молекулы.

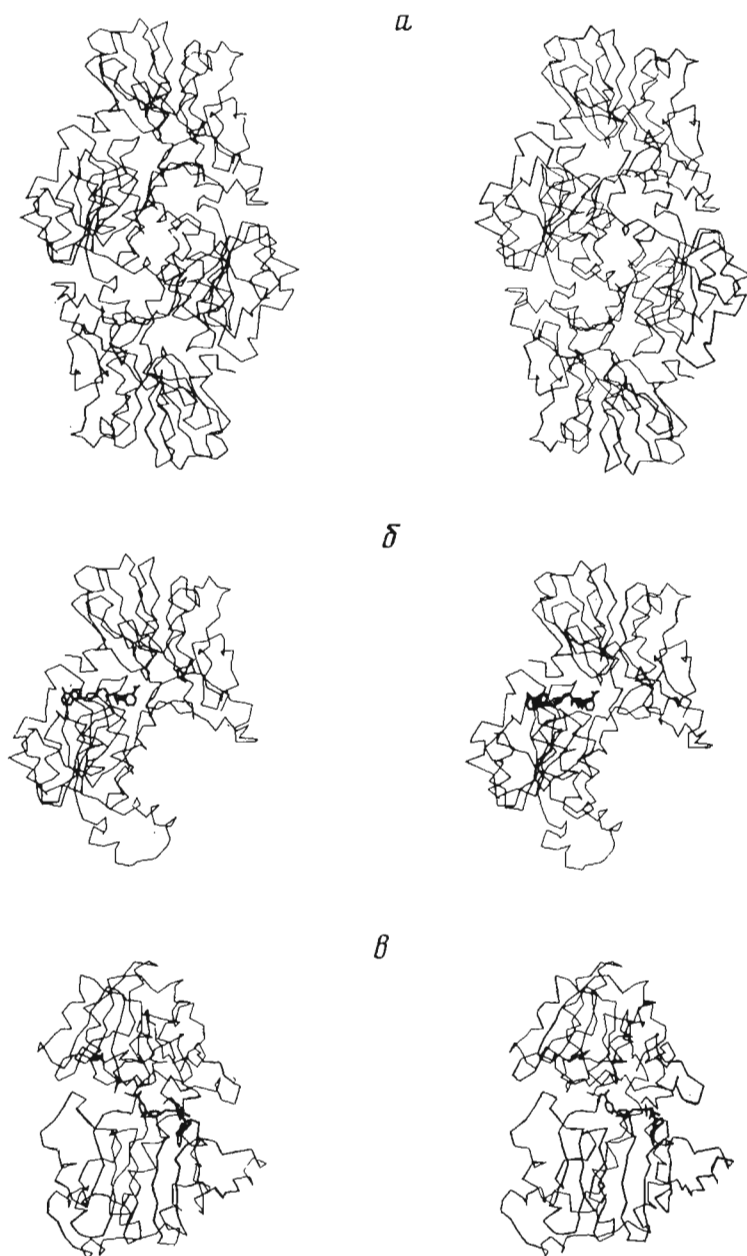


Рис. 1. Стереонизображение конформации полипептидной цепи в молекуле FDH: *a* — молекула фермента; *б, в* — субъединицы FDH, представленные в разных проекциях

В полипептидной цепи форматдегидрогеназы были локализованы элементы вторичной структуры (табл. 2, рис. 3). Для обозначения элементов вторичной структуры, составляющих NAD-связывающую область коферментсвязывающего домена, использована номенклатура, предложенная в работах [6, 7].

Содержание α -спиральных участков в молекуле форматдегидрогеназы составляет 41% в коферментсвязывающем домене, 29% в каталитическом домене и 35% по белку в целом. Фрагменты полипептидной цепи, имеющие конформацию β -цепей, составляют 24, 19 и 21%, а неупорядоченные участки — 35, 52 и 44% соответственно.

Каждый из доменов форматдегидрогеназы имеет в своей основе левозакрученный β -лист. β -Лист коферментсвязывающего домена состоит из

Вторичная структура субъединицы форматдегидрогеназы

Номера остатков	Обозначение фрагментов	Функциональное значение
2-9	$\alpha 1$	Экранирование активного центра от растворителя
15-18	$\beta 1$	—
60-65	$\alpha 2$	—
66-73	$\beta 2$	—
81-90	$\alpha 3$	—
91-95	$\beta 3$	—
99-102	$\beta 4$	Взаимодействие с никотинамидной частью
104-111	$\alpha 4$	—
115-120	$\beta 5$	Взаимодействие с никотинамидной частью
128-135	$\alpha 5$	—
136-142	$\beta 6$	—
147-164	αA	Межсубъединичный контакт
166-169	αB	То же
179-182	$\alpha 7$	»
192-197	βA	Взаимодействие с адениновым фрагментом
200-213	αB	Межсубъединичный контакт
214-220	βB	Взаимодействие с адениновым фрагментом
227-233	αC	Межсубъединичный контакт ?
234-239	βC	—
240-247	$\alpha 8$	—
250-256	βD	Взаимодействие с никотинамидной частью
268-272	αE	—
277-282	βE	Взаимодействие с никотинамидной частью
291-300	αF	—
303-308	βF	Взаимодействие с никотинамидной частью
318-324	αG	—
326-331	βG	—
337-356	$\alpha 9$	Экранирование активного центра от растворителя
363-368	$\beta 9$	То же

7 приблизительно параллельных β -цепей, а каталитического — из 6 (рис. 3). Угол поворота крайних β -цепей β -листов составляет около 90° для коферментсвязывающего и 80° для каталитического доменов.

NAD-связывающая область коферментсвязывающего домена форматдегидрогеназы состоит из двух элементов укладки полипептидной цепи по Россману (структура из трех параллельных β -цепей, соединенных α -спиралями [8] — βA — αB — βB — αC — βC (аденинсвязывающий субдомен) и βD — αE — βE — αF — βF (никотинамидсвязывающий субдомен), и имеет топологию, близкую к капонической [9]. Пары α -спиралей (αB и αC , αE и αF) расположены по разные стороны β -листа. Наряду с двумя петлями Россмана в β -листе коферментсвязывающего домена форматдегидрогеназы имеется дополнительная β -цепь, входящая в состав никотинамидной половины домена (βG), с соответствующей α -спиралью (αG), расположенной по ту же сторону β -листа, что и спирали αE и αF . Это обстоятельство отличает строение коферментсвязывающего домена форматдегидрогеназы от структуры классического коферментсвязывающего домена в LDH, MDH и LADH, который включает β -лист, состоящий только из 6 β -цепей. Другая характерная особенность коферментсвязывающего домена форматдегидрогеназы — протяженная (18 аминокислотных остатков) αA -спираль, соединяющая его с каталитическим доменом и обеспечивающая межсубъединичное взаимодействие коферментсвязывающих доменов в молекуле. Спираль αA расположена по ту же сторону β -листа, что и спирали αB и αC . Аналогичные элементы вторичной структуры были найдены в LDH (спираль $\alpha 3G$, принадлежащая каталитическому домену) и LADH (спираль αA , соединяющая каталитический и коферментсвязывающий домены) [10].

Молекулярная ось симметрии форматдегидрогеназы проходит приблизительно параллельно плоскости β -листа коферментсвязывающего домена белка. В связи с этим наиболее интенсивные контакты субъединиц в молекуле фермента осуществляются вдоль направления, перпендикулярного плоскости β -листа. В межсубъединичных контактах участвуют α -спирали

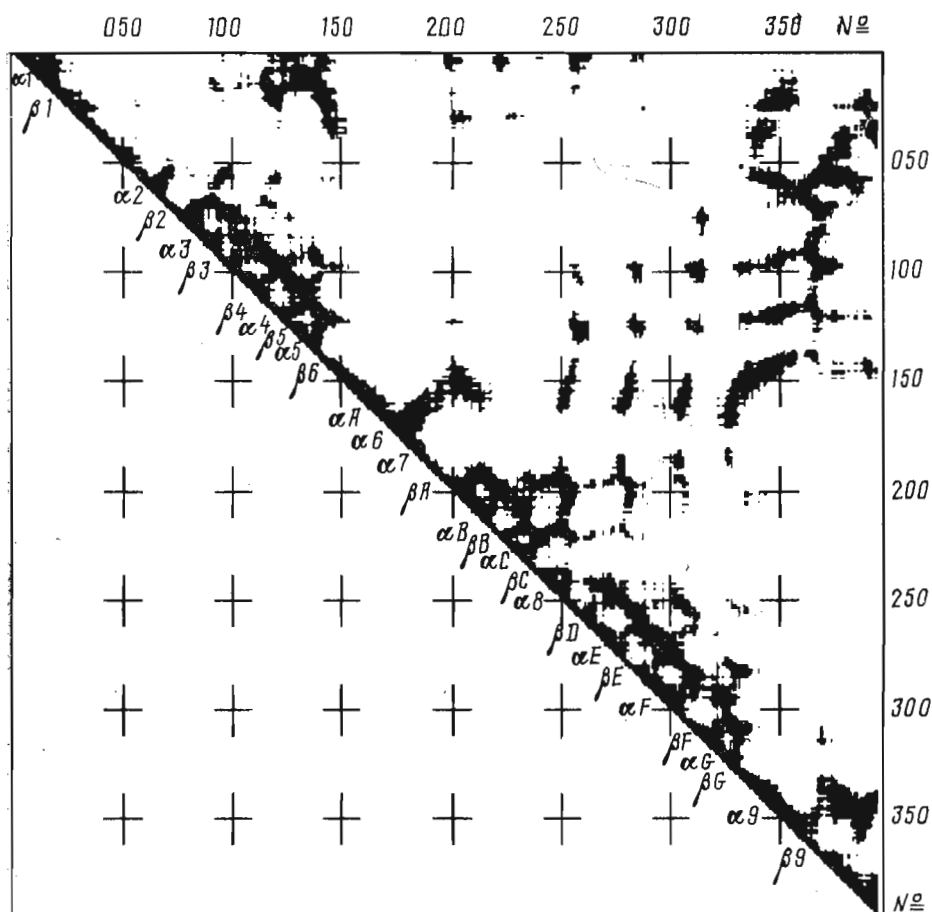


Рис. 2. Карта межатомных расстояний субъединицы FDH. Черным цветом указаны расстояния между соответствующими C^α -атомами, значения которых меньше 16 Å. На диагонали карты нанесены обозначения фрагментов полипептидной цепи (см. табл. 2 и [6, 7])

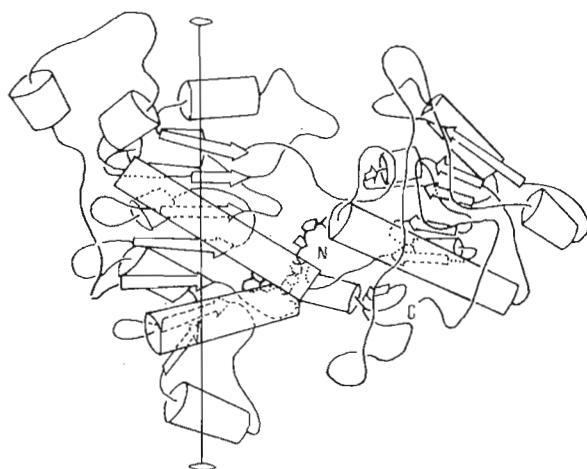


Рис. 3. Диаграммное представление структуры субъединицы FDH. Стрелками обозначены β -цепи, цилиндрами — α -спиральные участки. Две субъединицы молекулы связаны некристаллографической осью симметрии, показанной на рисунке. Жирными линиями представлена молекула NAD

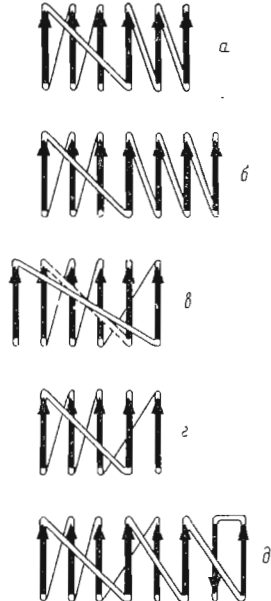


Рис. 4. Сравнение структурного мотива коферментсвязывающего (б) и каталитического (в) доменов FDH с родственными структурами: канонической структурой коферментсвязывающего домена (LDH, MDH, LADH) (а), d2-доменом глутатионредуктазы (г) и дигидрофолатредуктазы (д). Схема соединения β -цепей, входящих в состав доменов, представлены в соответствии с обозначениями Ричардсона [9]. Штриховой линией в каталитическом домене FDH отмечен коферментсвязывающий домен белка, расположенный между $\beta 6$ - и $\beta 9$ -цепями

αA , αB , αC , $\alpha 6$ и $\alpha 7$. Роль α -спиралей $\alpha 6$ и $\alpha 7$ следует оговорить особо. Эти элементы вторичной структуры располагаются на достаточно протяженном (с Tyr-165 до Ala-191) неупорядоченном участке полипептидной цепи, который участвует в формировании межсубъединичного взаимодействия в молекуле белка, контактируя с коферментсвязывающим доменом другой субъединицы и закрывая активный центр от воздействия растворителя. Взаимодействуя с коферментсвязывающим доменом, спирали $\alpha 6$ и $\alpha 7$ контактируют, кроме того, и с неупорядоченным фрагментом каталитического домена «соседней» субъединицы — петель, включающей остатки с Pro-39 по Gly-47.

Таким образом, в результате ассоциации двух субъединиц форматдегидрогеназы в молекуле белка создается обширное гидрофобное ядро, образованное приблизительно параллельными β -листами двух коферментсвязывающих доменов, принадлежащих соседним субъединицам, и заключенными между ними соответствующими α -спиралями.

В составе каталитического домена форматдегидрогеназы находятся 7 β -цепей, 6 из которых организованы в деформированный β -лист, на поверхности которого располагаются α -спирали: $\alpha 3$, $\alpha 4$ и $\alpha 5$ по одну сторону β -листа и $\alpha 2$ и $\alpha 9$ — по другую. Отметим, что по своей топологии каталитический домен форматдегидрогеназы отличается от соответствующих доменов в других NAD-зависимых дегидрогеназах, для которых в основном характерна антипараллельная β -структура [10].

Последовательность элементов вторичной структуры каталитического домена форматдегидрогеназы близка к структурному мотиву d2-домена глутатионредуктазы [11] и дигидрофолатредуктазы [12], которые, в свою очередь, принято рассматривать в качестве членов того же самого структурного семейства, к которому принадлежат и классические NAD-связывающие домены дегидрогеназ (рис. 4).

В качестве отдельного элемента каталитического домена могут быть выделены первые 18 аминокислотных остатков, образующие α -спираль (2–9: $\alpha 1$) и короткий фрагмент β -цепи (15–18: $\beta 1$), соединенные с остальной частью каталитического домена протяженным участком (41 аминокислотный остаток) неупорядоченной структуры. Функциональная роль этого α - β -элемента, по-видимому, заключается в экранировании активного центра фермента от растворителя при образовании каталитического комплекса, что может осуществляться перемещением спирали $\alpha 1$. Еще одна важная особенность каталитического домена форматдегидрогеназы — неупорядоченный участок, заключенный между $\beta 1$ и $\alpha 2$. О его взаимодей-

вии с элементами коферментсвязывающего домена (спирали $\alpha 6$ и $\alpha 7$) уже упоминалось. Следует отметить, что эта протяженная петля контактирует и с другими участками коферментсвязывающего домена соседней субъединицы, что должно вносить дополнительный вклад в прочность межсубъединичных контактов.

Активный центр каждой из субъединиц формиадегидрогеназы расположен в области контакта двух доменов и образован аминокислотными остатками, принадлежащими лишь «своей» субъединице. На картах электронной плотности хорошо видна молекула кофермента, электронная плотность которой четко отделяется от плотности, соответствующей молекуле белка. Молекула NAD в активном центре формиадегидрогеназы располагается в открытой конформации (рис. 3), как и в других дегидрогеназах [13]. Расстояние между центрами аденинового и никотинамидного фрагментов составляет около 14 Å. Адениновая часть молекулы кофермента ориентирована в раствор и может быть доступна воздействию растворителя. В организации активного центра формиадегидрогеназы участвуют аминокислотные остатки, принадлежащие как коферментсвязывающему, так и каталитическому домену фермента. Адениновая часть молекулы кофермента расположена в полости, образованной гидрофобными остатками, принадлежащими аденинсвязывающему субдомену коферментсвязывающего домена формиадегидрогеназы (участки полипептидной цепи Thr-196 — Ala-199 и Tyr-219 — His-223). Вход в активный центр со стороны адениновой части кофермента, как уже отмечалось, закрывает спираль $\alpha 1$, относящаяся к каталитическому домену белка. Область связывания никотинамидной части молекулы NAD образована участками цепи каталитического домена (Gln-96 — Phe-98, Ala-120 — Ser-124) и коферментсвязывающего домена (Val-145 — His-153, Gys-255 — Pro-259, Asn-281 — Arg-284, Gly-307 — Val-309 и His-332 — Thr-337). Роль дополнительного седьмого элемента β -листа (αG - βG) заключается, вероятно, в организации участка полипептидной цепи, экранирующего никотинамидный фрагмент молекулы кофермента в активном центре от воздействия растворителя. Непосредственно экранирование осуществляет неупорядоченный участок с Val-309 по Lys-317. Вход в активный центр в области никотинамидсвязывающего участка закрывает также петля с Leu-257 по Glu-262.

В связи с тем что электронная плотность, соответствующая аниону азид-а, на картах электронной плотности при данном разрешении не проявляется, локализация субстратсвязывающего участка активного центра на данном этапе не представляется возможной.

Таким образом, проведенное рентгеноструктурное исследование бактериальной формиадегидрогеназы дает четкое представление об организации белковой глобулы на уровне хода полипептидной цепи, а привлечение данных о первичной структуре белка позволяет сделать определенные выводы об организации активного центра фермента.

Экспериментальная часть

Структуру фермента определяли методом полинормального замещения. Тяжелoaтомные производные для FDN (уранилацетат и РСМВ-2) были получены как описано ранее [2]. Производное РСМВ-1 получено по той же методике, что и РСМВ-2, однако время настаивания было увеличено до 48 ч при четырехкратном избытке модификатора по отношению к количеству белка в кристалле. Наборы интенсивностей рентгеновских отражений для РСМВ-2-производного с четырьмя местами связывания получали на дифрактометре Syntex P2₁ (США). Измерения отражений производились с одного кристалла в независимой части обратного пространства до падения интенсивностей контрольных отражений не более чем на 15%. Экспериментальные данные для остальных производных и нативного белка были сняты на координатном дифрактометре КАРД (Институт кристаллографии АН СССР) с двумерным детектором, что дало возможность провести измерение каждого из наборов на одном кристалле. Измеряли 3—4 эквивалентных отражения от разрешения 3,0 Å, при этом скорость ска-

нирования подбирали такой, чтобы радиационный распад кристалла не превышал 3–5%. Использовали методики съемки, описанные в работах [14, 15]. Учет поправок Лоренца и на распад, поглощение и поляризацию, а также шкалирование наборов проводили по стандартным методикам [16, 17]. Для компенсации систематических ошибок, возникающих из-за съемки производного и нативного кристалла по различным методикам, набор, полученный на дифрактометре Syntex P2, шкалировался к нативному анизотропно.

Уточнение параметров тяжелых атомов и расчет фаз производили как описано ранее [2]. Для повышения качества синтеза была применена процедура молекулярного усреднения с последующим комбинированием фаз [18]. После трех циклов комбинирования фактор достоверности в определении фаз (m) возрос с 0,58 до 0,82. Использовали расчетные и графические программы, разработанные сотрудниками Института кристаллографии АН СССР А. А. Вагиным, А. И. Рыскиным и Б. В. Строкопытовым.

Синтез электронной плотности кристаллов белка с разрешением 3,0 Å был нарисован на прозрачных пленках в масштабе 2,5 Å/см при разбиении элементарной ячейки по осям X , Y и Z на 116, 112 и 64 части соответственно. При проведении хода полипептидной цепи по мини-картам учитывалось положение максимумов электронной плотности боковых групп, а расстояние между C^α -атомами принималось равным 3,8 Å.

Авторы выражают искреннюю признательность сотрудникам Института кристаллографии АН СССР Ю. В. Некрасову, С. В. Рубинскому и А. Н. Попову за помощь в осуществлении съемки кристаллов форминатдегидрогеназы на дифрактометрах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попов В. О., Шумилин П. А., Устинникова Т. Б., Ламзин В. С., Егоров Ц. А. // Биоорганич. химия. 1990. Т. 16. № 3. С. 324–335.
2. Деведжиев Я., Мороз О. В., Арутюнян Э. Г., Ламзин В. С., Егоров А. М., Попов В. О., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 286. № 3. С. 757–760.
3. Hermes I. J., Morrical S. W., O'Leary M. H., Cleland W. W. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 23. P. 5479–5488.
4. Алешин А. Е., Ламзин В. С., Деведжиев Я. Д., Рубинский С. В., Попов В. О., Егоров А. М., Арутюнян Э. Г., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 294. № 4. С. 973–976.
5. Rossmann M. G., Liljas A., Branden C.-I., Banaszak L. J. // The Enzymes/Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press. 3rd ed. 1975. V. 11. Part A. P. 61–102.
6. Adams M. G., Ford G. C., Koekoek R., Lentz P. J., McPherson A., Rossmann M. G., Smiley I. E., Shewitz R. W., Wonacott A. J. // Nature. 1970. V. 227. № 5263. P. 1098–1103.
7. Hill E. I., Tsernoglou D., Webb L., Banaszak L. J. // J. Mol. Biol. 1972. V. 72. № 3. P. 577–591.
8. Rao S. T., Rossmann M. G. // J. Mol. Biol. 1973. V. 76. № 2. P. 241–256.
9. Richardson J. S. // Adv. in Protein Chemistry/Eds. Anfinsen C. B., Edsall J. T., Richards F. M. N. Y.: Acad. Press, 1981. V. 34. P. 167–339.
10. Branden C.-I., Eklund H. // Dehydrogenases Requiring Nicotinamid Coenzymes/Ed. Jeffery J. Basel: Birkhauser, 1980. P. 41–84.
11. Schulz C. E., Shirmer R. H., Sachsenheimer W., Pai E. F. // Nature. 1978. V. 273. P. 120–124.
12. Matthews D. A., Alden R. A., Bolin J. T., Freer S. T., Hamlin R., Xuong N., Kraut J., Poe M., Williams M., Hoogstein K. // Science. 1977. V. 197. P. 452–455.
13. Rossmann M. G., Moras D., Olsen K. W. // Nature. 1974. V. 250. № 5463. P. 194–199.
14. Некрасов Ю. В. // Кристаллография. 1988. Т. 33. Вып. 3. С. 795–797.
15. Andrianova M. E., Harutyunyan E. H., Kheiker D. M., Popov A. N., Chernenko S. P., Ivanov A. B., Peshekhonov V. D., Zanevsky Yu. V. // 8th Eur. Cryst. Meeting. Liege. 1983. P. 30.
16. North A. C. T., Philips D. C., Matthews F. S. // Acta crystallogr. 1968. V. A24. P. 351–359.
17. Wilson A. J. C. // Acta crystallogr. 1949. V. 2. P. 318–322.
18. Bricogne C. // Acta crystallogr. 1976. V. A32. P. 832–847.

Поступила в редакцию

4.IV.1989

После доработки

20.X.1989

NAD-DEPENDENT FORMATE DEHYDROGENASE FROM METHYLOTROPHIC
BACTERIUM *PSEUDOMONAS* sp. 101. II. THREE-DIMENSIONAL
STRUCTURE AT 3.0 Å RESOLUTION

*A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow;*

** A. V. Shubnikov Institute of Crystallography, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Three heavy atom isomorphous derivatives were used for the X-ray analysis of the holo form of NAD-dependent bacterial formate dehydrogenase (ternary complex enzyme-NAD-azide) at 3.0 Å resolution. The enzyme subunit contains a catalytic and a coenzyme binding domain, with the active centre and the coenzyme binding site in the cleft between the domains. The polypeptide chain's fold and the position of 393 C α -atoms were determined. The secondary structure of the formate dehydrogenase was resolved. The structure of the NAD-binding domain is shown to be similar to that of other NAD-dependent enzymes.