



УДК 577.152.34.012.7

## ПРОТЕИНАЗА ВИРУСА ГРАВИРОВКИ ТАБАКА: КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА АКТИВНОГО ФЕРМЕНТА И ЕГО НЕАКТИВНОГО МУТАНТА

© 2003 г. А. С. Жданов<sup>1</sup>, Дж. Фан, А. Г. Евдокимов<sup>2</sup>, Дж. Тропиа, Х. К. Питерс III,  
Р. Б. Капуст, М. Ли<sup>3</sup>, А. Влодавер, Д. С. Вуа

*Лаборатория кристаллографии макромолекул, центр исследований рака,  
Национальный институт рака, Фредерик, Мэриленд, США, 21702-1201*

Поступила в редакцию 20.12.2002 г. Принята к печати 07.02.2003 г.

Протеиназа вируса гравировки табака (TEV-протеиназа) нашла широкое применение в качестве инструмента для отделения рекомбинантных целевых белков от белков-носителей. Кристаллические структуры двух мутантов TEV-протеиназы – активного, устойчивого к автолизу мутанта TEV-S219D (в комплексе с продуктом протеолитической реакции), и неактивного мутанта TEV-C151A (в комплексе с субстратом) были определены при разрешении 1.8 и 2.2 Å. Показано, что не только активные центры, но и оксианионные впадины обоих мутантов имеют одинаковую структуру. Обнаружено, что C-концевые остатки фермента 217–221 вовлечены в формирование связывающих карманов S<sub>3</sub>–S<sub>6</sub>, вследствие чего автолиз по пептидной связи Met218–Ser219 оказывает сильное воздействие на положение субстрата в активном центре и приводит к значительному уменьшению активности фермента.

*Ключевые слова:* цистеиновые протеиназы, TEV-протеиназа, автолиз, кристаллическая структура, вирус гравировки табака.

### ВВЕДЕНИЕ

Вирус гравировки табака (tobacco etch virus, TEV) принадлежит к семейству потивирусов, которые в свою очередь являются подсемейством большой группы вирусов, содержащих РНК положительной полярности и вызывающих многие болезни как у растений, так и у животных [1]. Одиночная открытая рамка считывания TEV-РНК кодирует полибелок с молекулярной массой около 346 кДа [2]. Обнаружено, что вирус гравировки табака содержит три протеолитических фермента [3]: P1-, HC-Pro- и NIa-протеиназы. На начальном этапе все они автокаталитически самовысвобождаются с N-конца полибелка, однако только NIa-протеиназа участвует во всех последующих этапах протеолиза. Белок NIa, имеющий общую молекулярную массу 49 кДа, состоит из двух субъединиц с M 21 и 27 кДа. Большая субъединица является цистеиновой протеиназой

и, как было показано, на поздних стадиях инфекции существует как независимый белок, который и был назван TEV-протеиназой. Установлено, что структурно TEV-протеиназа похожа на сериновые протеиназы трипсин и химотрипсин, однако в качестве активного нуклеофила в ней функционирует тиольная группа цистеина [4, 5].

Благодаря своей высокой специфичности TEV-протеиназа широко применяется в биотехнологии для протеолитического отщепления как аффинных меток, так и белков-носителей от рекомбинантных целевых белков [6]. Согласно литературным данным, TEV-протеиназа в отличие от фактора Ха, энтерокиназы и тромбина не способна гидролизовать химерный белок в неспецифических для нее сайтах. Консенсусная последовательность расщепления TEV-протеиназой, начиная с позиции P<sub>6</sub>, имеет вид: Glu-Xaa-Xaa-Tyr-Xaa-Gln\*Ser/Gly (знаком \* показана расщепляемая связь) [7], тогда как лучшая последовательность для расщепления: Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln\*Gly/Ser [8]. Хотя специфичность TEV-протеиназы по отношению к этим аминокислотным последовательностям очень высока, она не абсолютна. Было показано, что фермент может подвергаться автолизу по связи Met218–Ser219, давая в результате укороченный белок со значительно пониженной активностью

Сокращения: IPTG – изопропил-β-D-тиогаляктопиранозид; PEG 6000 – полиэтиленгликоль (M 6000 Да).

<sup>1</sup> Автор для переписки (тел.: (301) 846-53-44; факс: (301) 846-71-01; эл. почта: zdanov@ncifcrf.gov).

<sup>2</sup> Настоящий адрес: Проктер и Гамбл Фармацевтикал, Центр медицинских исследований, 8700, ул. Майсон-Монтгомери, Майсон, Огайо, США, 45040-9462.

<sup>3</sup> Программа поддержки научных исследований, САИК, Фредерик, Мэриленд, США, 21702-1201.

[3, 9]. Важно отметить, что автолиз был отмечен только *in vitro*, при этом сайт расщепления оказался неожиданным, так как последовательность, включающая этот сайт, -Gly-His-Lys-Val-Phe-Met\*Ser-, имеет мало общего и с консенсусной, и с лучшей последовательностями: только остатки фенилаланина в положении  $P_2$  и серина в положении  $P_1$  совпадают с каноническими последовательностями. Именно поэтому явление аутолиза интенсивно изучалось в последнее время [9], и на основе этих исследований был предложен ряд устойчивых мутантов фермента.

Мы определили кристаллические структуры двух вариантов TEV-протеиназы. Один из них – мутант TEV-S219D, – устойчивый к протеолизу активный фермент, тогда как второй мутант – TEV-C151A – неактивен, поскольку у него каталитически активный остаток цистеина 151 заменен на аланин. Оба белка были закристаллизованы в форме комплексов либо с продуктом протеолитической реакции (TEV-S219D), либо с субстратом (TEV-C151A) [10].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Общая структура

Несмотря на то что как TEV-S219D (рис. 1), так и TEV-C151A являются димерами в кристалле, состоящими из молекул А и В, структура димера в каждом случае различна. Показано, что при физиологических условиях, а также в растворе TEV-протеиназа представляет собой мономер (неопубликованные данные), однако способ агрегации фермента не является предметом настоящей публикации, и подробное обсуждение этой проблемы будет представлено в работе [10]. Важно также отметить, что хотя димеры мутантов TEV-протеиназы абсолютно разные, структуры мономеров мутантных форм фермента очень похожи; среднеквадратичное отклонение между положениями  $\alpha$ -атомов составляет всего 0.24 Å.

TEV-протеиназа состоит из двух доменов, имеющих форму антипараллельных  $\beta$ -бочонков, при этом каталитически важные аминокислотные остатки (His46, Asp81 и Cys151) находятся в междоменном промежутке (рис. 2). С-Концевой фрагмент TEV-протеиназы имеет неупорядоченную структуру и локализовать положение образующих его остатков (а. о. 222–236) не удалось, за исключением семи последних остатков (230–236), принадлежащих молекуле В' активного мутанта TEV-S219D (т.е. молекуле В, которая симметрично связана с независимой молекулой В в кристалле). Эти остатки формируют  $\beta$ -тяж, параллельный тяжу 62–67, расширяя уже имеющуюся четырехтяжевую  $\beta$ -плоскость (рис. 1). Взаимодействие такого рода может сформироваться только в процессе образования кристалла, а потому является артефактом кристаллизации.

### Активный центр

Активные центры обоих мутантов TEV-протеиназы имеют абсолютно одинаковую структуру, включая как оксианионную впадину, так и “карманы” связывания. Связанные в активном центре полипептиды имеют вытянутую конформацию (рис. 3), которая почти одинакова в обоих случаях. Как и ожидалось, в случае мутанта TEV-S219D, гептапептидный субстрат Ac-Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly гидролизировался по связи между остатками Gln и Gly, однако продукт реакции остался в активном центре. Все шесть аминокислотных остатков продукта протеолитической реакции ясно видны на картах электронной плотности [10], причем остаток Tyr принимает альтернативные конформации в молекулах А и В. Причина, по которой продукт реакции оказался связанным в активном центре, до сих пор до конца не выяснена, хотя известно, что разные цистеиновые протеиназы проявляют разные требования к длине гидролизуемых субстратов [11]. Мы считаем, что гептапептид, по-видимому, полностью удовлетворяет всем условиям протеолитической реакции, обеспечивающим гидролиз пептидной связи, однако такой субстрат слишком короток, чтобы покинуть активный центр. Значительное удаление N-концевой части фермента от активного центра, а также способность С-концевого тяжа к изменению своей конформации и близость его к активному центру могут означать, что высвобождение TEV-протеиназы из полибелка-предшественника, по-видимому, происходит по межмолекулярному (*trans*) механизму на N-конце и по внутримолекулярному (*cis*) – на С-конце.

### Заключение

Как уже упоминалось, TEV-протеиназа подвержена автолизу по связи Met218–Ser219 *in vitro*, давая укороченный и во много раз менее активный фермент [3, 9]. Никаких сведений о том, что это явление происходит *in vivo* или имеет какое-нибудь физиологическое значение нет. Однако автолиз представляет большую проблему на различных этапах выделения и очистки фермента, когда он может быть вызван просто увеличением концентрации фермента. Мутант TEV-S219D оказался примерно в 10 раз устойчивее к автолизу, чем нативный белок, при этом он сохраняет полную активность [9]. Структуры S219D- и C151A-мутантов TEV-протеиназы показывают, что расщепляемая связь Met218–S219 расположена на расстоянии всего лишь в 5 Å от активного центра, а также то, что остатки, следующие за позицией 219, вовлечены в формирование связывающих карманов  $S_3$ – $S_6$  (рис. 3). Таким образом, с очень большой долей вероятности можно считать, что автолиз – внутримолекулярное явление. Мы также убедились, что TEV-протеиназа совершенно

не гидролизует полипептиды, включающие аминокислотную последовательность, идентичную с окружением сайта автолиза Gly-Gly-His-Lys-Val-Phe-Met\*Ser-Lys-Pro-Arg-Arg (а. о. 212–223). Следовательно, инициируемый концентрацией автолиз должен начинаться с изменения конформации С-концевого тяжа фермента, приводящего к правильной ориентации приведенной выше аминокислотной последовательности в активном центре фермента. В то же время кристаллические структуры активного и неактивного мутантов позволяют объяснить, почему укороченный фермент теряет протеолитическую активность. Причина заключается в том, что остатки, непосредственно следующие за пептидной группой, расщепляемой в процессе автолиза, участвуют в формировании  $S_3$ – $S_6$ -связывающих карманов, и потому их удаление несомненно оказывает воздействие на взаимодействие субстрата с ферментом.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### Получение, выделение и кристаллизация белка.

Оба мутанта TEV-протеиназы были экспрессированы как химерные белки, в которых связывающий мальтозу белок (МВР) выступал в роли белка-носителя, а в качестве аффинных меток были использованы Gly-His<sub>7</sub>- (для TEV-S219D) или His<sub>6</sub>-последовательности (для TEV-C151A), локализованные на N-концах соответствующих мутантов TEV-протеиназы [12]. Для отщепления белков-носителей были использованы TEV-протеиназа или протеиназа вируса крапчатости жилок листьев табака (TVMV-протеиназа), при этом места расщепления были сконструированы между МВР и гистидиновыми аффинными метками. Оба белка были получены в клетках *E. coli* BL21(DE3), содержащих дополнительную плазмиду, кодирующую либо TVMV-, либо TEV-протеиназу, для внутриклеточного отщепления МВР.

Клетки выращивали при температуре 37°C в конической колбе с покачиванием в бульоне Луриа, содержащем соответствующие антибиотики. Культуру индуцировали в течение 4 ч добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ с одновременным понижением инкубационной температуры до 30°C. Биосинтез мутанта TEV-C151A с замещенными на селено-метионин остатками метионина проводили в соответствии с процедурой, описанной Дюбли [13]. На первом этапе белки были выделены аффинной хроматографией с применением гистидиновых меток, после чего следовали катионообменная хроматография (для TEV-S219D) или гель-фильтрация (для TEV-C151A). Непосредственно перед кристаллизацией белки были смешаны с соответствующим субстратом в соотношении 1 : 5.

Кристаллизация проводилась с помощью метода висячей капли, содержащей одинаковые ко-

личества белкового и резервуарного растворов. В случае TEV-S219D резервуарный раствор содержал 0.1 М Трис-НСl, рН 8.5, 0.2 М MgCl<sub>2</sub>, 10% глицерин, 2.0 М сульфат аммония; в случае TEV-C151A – 0.1 М Трис-НСl, рН 8.0 и PEG 6000. Кристаллы как TEV-S219D, так и TEV-C151A принадлежат к тетрагональной сингонии,  $a = b = 75.5 \text{ \AA}$ ,  $c = 183.2 \text{ \AA}$ , пространственная группа  $P4_32_12$  (для TEV-S219D) и  $a = b = 125.3 \text{ \AA}$ ,  $c = 127.9 \text{ \AA}$ , пространственная группа  $P4_22_12$  (для TEV-C151A). Независимая часть элементарной ячейки содержит в обоих случаях две молекулы.

**Сбор данных и решение кристаллической структуры.** Сбор дифракционных данных в обоих случаях проводился при 100 К: на станции X9В в Брукхэвене в случае TEV-S219D и на станции 17ID в Аргоннской национальной лаборатории в случае TEV-C151A. Данные для кристаллов селенозамещенного мутанта TEV-C151A были собраны с использованием трех длин волн вблизи края аномального поглощения атома Se. Обработка данных проводилась с помощью комплекса программ HKL2000 [14].

Кристаллическая структура неактивного мутанта TEV-C151A была решена с помощью метода мультиволновой аномальной дисперсии (MAD) с применением комплекса программ автоматического поиска решений SOLVE/RESOLVE [15]. Начальная полиаланиновая модель была построена при разрешении 2.2 Å и включала в себя 75% полной структуры. Все ручные манипуляции с моделью, включая идентификацию аминокислотных остатков, проводились с помощью программы O [16].

Кристаллическая структура активного мутанта TEV-S219D была решена методом молекулярных замещений с помощью программы AmoRe [17] и с использованием структуры мономера неактивного мутанта TEV-C151A в качестве начальной модели. Кристаллографическое уточнение обеих структур было проведено с помощью комплекса программ CNS [18]. Уточненная структура TEV-S219D включает димер молекул А и В, каждая в комплексе с гексапептидом – продуктом протеолитической реакции в активном центре. В молекуле А удалось локализовать остатки от –8 до 221, при этом первые восемь аминокислот соответствуют гистидиновой аффинной метке (Gly-His<sub>7</sub>), тогда как в молекуле В установлена структура только остатков 3–221, кроме этого локализованы 577 молекул воды, а также гептапептид, соответствующий остаткам 230–236 молекулы А.

Уточненная структура TEV-C151A включает димер молекул А и В, каждая в комплексе с пептидным субстратом, 182 молекулы воды и две молекулы глицерина. Как координаты, так и структурные факторы обеих структур депонированы в

Protein Data Bank под кодами 1lvn и 1lvb для TEV-S219D и TEV-C151A соответственно.

Авторы выражают благодарность С.В. Козлову (Национальный институт рака, Фредерик), Э.Э. Мельникову и Т.В. Ротановой (ИБХ РАН, Москва) за полезные замечания в процессе написания статьи. Работа была частично финансирована из Федерального бюджета от Национального института рака, Национального института здоровья по контракту № NO1-CO-12400.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ryan M.D., Flint M. // J. Gen. Virol. 1997. V. 78. P. 699–723.
- Dougherty W.G., Cary S.M., Parks T.D. // Virol. 1989. V. 171. P. 356–364.
- Parks T.D., Howard E.D., Wolpert T.J., Arp D.J., Dougherty W.G. // Virol. 1995. V. 210. P. 194–201.
- Gorbalenya A.E., Donchenko A.P., Blinov V.M., Koonin E.V. // FEBS Lett. 1989. V. 243. P. 103–114.
- Dougherty W.G., Parks T.D., Cary S.M., Bazan J.F., Fletterick R.J. // Virol. 1989. V. 172. P. 302–310.
- Stevens R.C. // Structure. 2000. V. 8. R177–R185.
- Parks T.D., Dougherty W.G. // Virol. 1991. V. 182. P. 17–27.
- Parks T.D., Leuther K.K., Howard E.D., Johnston S.A., Dougherty W.G. // Anal. Biochem. 1994. V. 216. P. 413–417.
- Kapust R.B., Tözsér J., Fox J.D., Anderson D.E., Cherry S., Copeland T.D., Waugh D.S. // Protein Eng. 2001. V. 14. P. 993–1000.
- Phan J., Zdanov A., Evdokimov A.E., Tropea J.E., Peters III, H.K., Kapust R.B., Li M., Wlodawer A., Waugh D.S. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 50564–50572.
- Gorbalenya A.E., Snijder E.J. // Perspect. Drug Discov. Design. 1996. V. 6. P. 64–86.
- Kapust R.B., Waugh D.S. // Protein Sci. 1999. V. 8. P. 1668–1674.
- Doublie S. // Meth. Enzymol. 1997. V. 276. P. 523–530.
- Otwinowski Z., Minor W. // Meth. Enzymol. 1997. V. 276. P. 307–326.
- Terwilliger T.C., Berendzen J. // Acta Crystallogr. 1999. V. D55. P. 849–861.
- Kleywegt G.J., Jones T.L. // Meth. Enzymol. 1997. V. 277. P. 525–545.
- Navaza J. // Acta Crystallogr. 1994. V. A50. P. 157–163.
- Brunger A.T., Adams P.D., Clore G.M., DeLano W.L., Gros P., Grosse-Kunstleve R.W., Jiang J.S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N.S., Read R.J., Rice L.M., Simonson T., Warren G.L. // Acta Crystallogr. 1998. V. D54. P. 905–921.

## Tobacco Etch Virus Protease: Crystal Structure of the Active Enzyme and Its Inactive Mutant

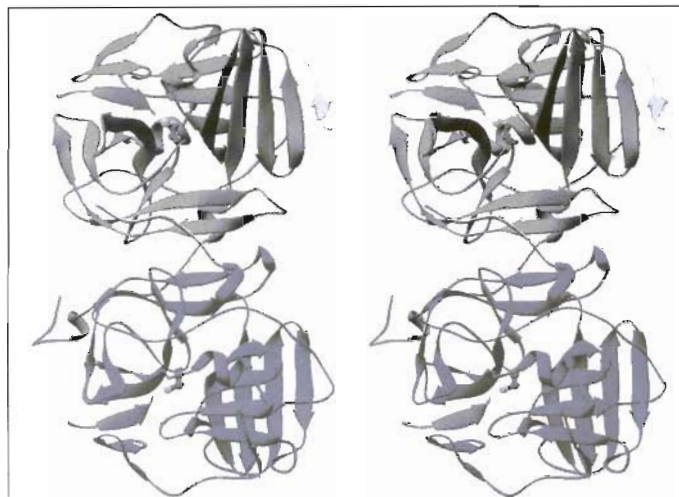
A. S. Zdanov<sup>#</sup>, J. Phan, A. G. Evdokimov, J. E. Tropea, H. K. Peters III, R. B. Kapust, M. Li, A. Wlodawer, and D. S. Waugh

<sup>#</sup>Phone: +1 (301) 846-5344; fax: +1 (301) 846-7101; e-mail: zdanov@ncicrf.gov

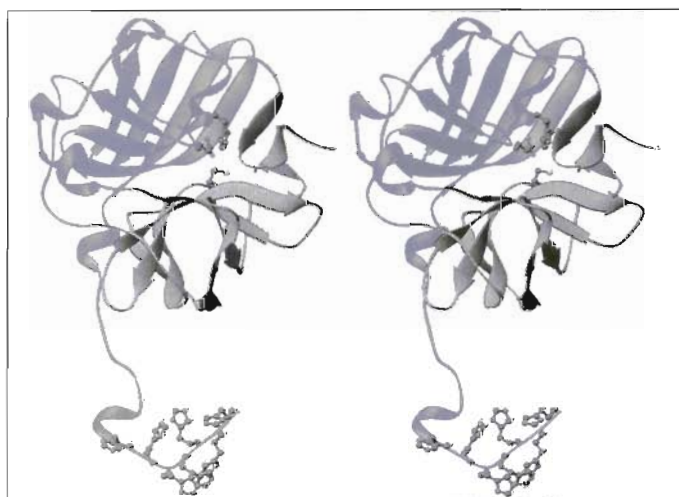
Macromolecular Crystallography Laboratory, Center for Cancer Research, National Cancer Institute at Frederick, MD, 21702-1201 United States

Tobacco Etch Virus Protease (TEV protease) is widely used as a tool for separation of recombinant target proteins from their fusion partners. The crystal structures of two mutants of TEV protease, active autolysis-resistant mutant TEV-S219D in complex with the proteolysis product, and inactive mutant TEV-C151A in complex with a substrate, have been determined at 1.8 and 2.2 Å resolution, respectively. The active sites of both mutants, including their oxyanion holes, have identical structures. The C-terminal residues 217–221 of the enzyme are involved in formation of the binding pockets  $S_3$ – $S_6$ . This indicates that the autolysis of the peptide bond Met218–Ser219 exerts a strong effect on the fine-tuning of the substrate in the enzyme active site, which results in considerable decrease in the enzymatic activity. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

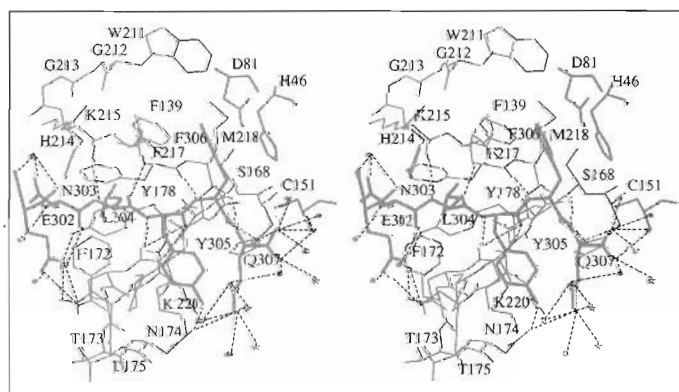
Key words: autolysis, crystal structure, cysteine proteases, TEV protease, tobacco etch virus



**Рис. 1.** Стереизображение димера активного мутанта TEV-S219D. Молекула А показана зеленым цветом, молекула В – красным, Gly-His<sub>7</sub> – фиолетовым, С-концевой тяж 230–236 – желтым, продукт реакции – синим. Атомы углерода и валентные связи активного цистеина 151 окрашены в фиолетовый цвет, серы – в желтый.



**Рис. 2.** Стереизображение мономера TEV-S219D. Атомы углерода и серы активной триады фермента показаны как на рис. 1, атомы азота показаны синим цветом, а кислорода – красным. Отдельные домены, имеющие форму β-бочонков, показаны красным и зеленым цветом.



**Рис. 3.** Стереизображение активного центра мутанта TEV-S219D. Продукт реакции показан фиолетовым цветом, белок – зеленым, остатки активной триады фермента – синим, молекулы воды – красным. Пунктирные линии показывают все расстояния короче 3.5 Å между атомами, которые потенциально могут быть вовлечены в образование водородных связей.