



УДК 577.361*1'434:577.112.088.52

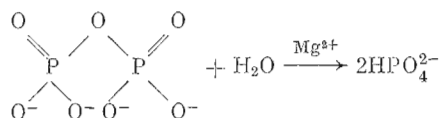
ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ ПРИ РАЗРЕШЕНИИ 3 А

*Герзля С. С., Воронова А. А., Смирнова Е. А.,
Куранова И. П., Некрасов Ю. В., Арутюнян Э. Г.*.,
Вайнштейн Б. К., Хёне В**., Хансен Г.***

*Институт кристаллографии Академии наук СССР, Москва;
** Университет им. А. Гумбольдта, Берлин*

По синтезам электронной плотности с разрешением 3 А (фазы рассчитаны с использованием трех тяжелоатомных производных и уточнены методом молекулярной сметрии) построена атомная модель неорганической пирофосфатазы дрожжей, установлены состав и строение активного центра. Методом разпостных синтезов исследованы комплексы с Mg^{2+} , Tb^{3+} и пирофосфатом кальция и выявлены аминокислотные остатки, которые могут участвовать в их связывании.

Неорганическая пирофосфатаза (КФ 3.6.1.1), чрезвычайно широко распространенная в природе, относится к ферментам фосфорного обмена. Основной катализируемой реакцией является гидролиз макроэргической фосфоангидридной связи неорганического пирофосфата:



Эта реакция универсальна для всех живых организмов. Расщепление пирофосфата, образующегося в ряде обменных процессов, сдвигает в сторону синтеза общее равновесие системы последовательных реакций, приводящих к образованию белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот — практически всех биологически важных соединений. Пирофосфатаза проявляет ферментативную активность только в присутствии некоторых ионов двухвалентных металлов и, следовательно, относится к металлозависимым ферментам. В клетке активатором фермента является магний.

Недавно открыта еще одна особенность пирофосфатазы [1, 2]. Оказалось, что в определенных условиях в отсутствие внешнего источника энергии она катализирует синтез макроэргической пирофосфатной связи, т. е. написанная выше реакция может быть обратимой.

Перечисленные особенности привлекают внимание многих ученых к исследованию пирофосфатаз. Неудивительно, что свойства, в частности, неорганической пирофосфатазы дрожжей интенсивно изучаются в нескольких лабораториях — Аваевой (СССР), Купермана, Бойера, Хейнриксона (США), Рапопорта, Хёне (ГДР). Установлена молекулярная масса неорганической пирофосфатазы дрожжей, равная 64 000; показано, что молекула представляет собой димер, состоящий из двух идентичных субъединиц. Определена последовательность аминокислотных остатков, составляющих полипептидную цепь пирофосфатазы [3], исследован ряд закономерностей при взаимодействии пирофосфатазы с ионами двухвалентных металлов [4—8]. Однако пространственная структура неорганической пирофосфатазы и других ферментов этого класса до сих пор не была определена.

* Автор, которому следует направлять требования на оттиски.

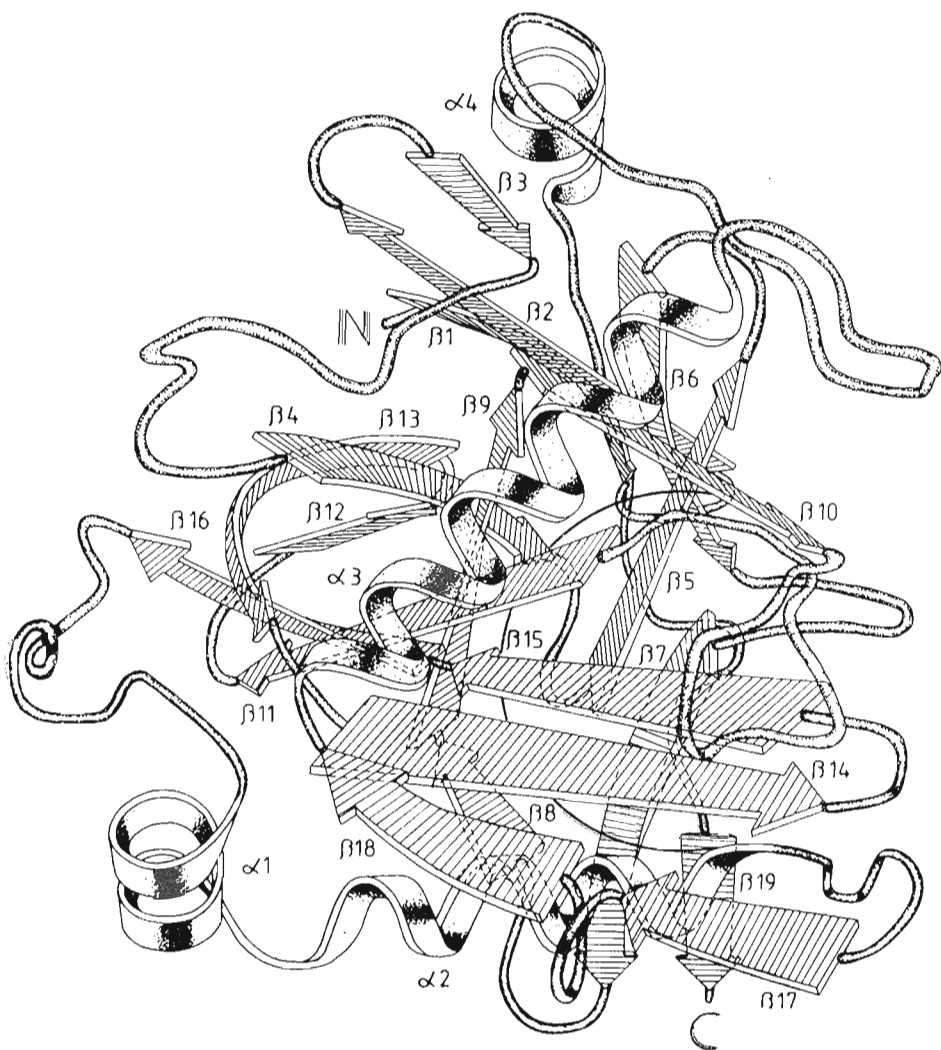


Рис. 1. Схематическое изображение хода полипептидной цепи в субъединице молекулы неорганической пирофосфатазы. β -Цепи показаны стрелками, α -спирали — широкими лентами, нерегулярные участки — тонкими. Нумерация элементов структуры на рисунке соответствует тексту

Работы по изучению пространственной структуры неорганической пирофосфатазы дрожжей ведутся параллельно в Пенсильванском университете (США) и в лаборатории структуры белка Института кристаллографии АН СССР. Опубликованная в 1978 г. статья американских исследователей содержит описание структуры молекулы пирофосфатазы при низком разрешении [9]. Нами в настоящее время завершено построение атомной модели неорганической пирофосфатазы и исследованы ее комплексы с пирофосфатом кальция, ионами тербия (разрешение 5 Å) и магния (3,2 Å). На основе этих данных предложен способ связывания молекулы пирофосфата и ионов металлов, принимающих участие в каталитическом акте.

Описание общего хода полипептидной цепи одиночной субъединицы молекулы неорганической пирофосфатазы (рис. 1) опубликовано нами ранее [10].

Ниже рассматривается полная атомная модель, построенная в компараторе Ричардса по синтезу электронной плотности с разрешением 3 Å. На рис. 2 приведена схема вторичной структуры, установленной по атомной модели (см. также табл. 1). N-Концевая часть цепи имеет вытянутую конформацию, семь остатков этого участка (2–8) образуют β -цепь ($\beta 1$).

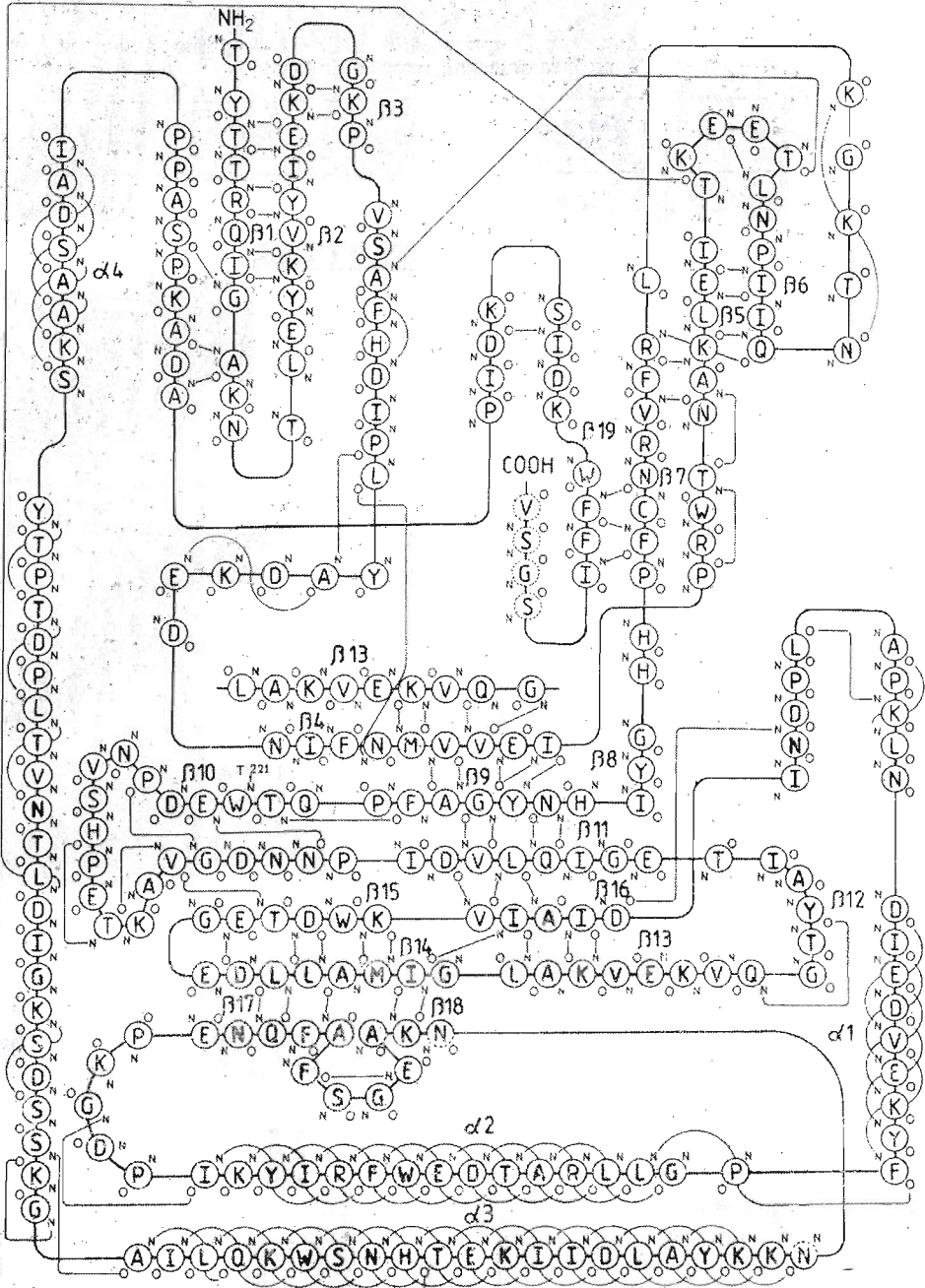


Рис. 2. Вторичная структура субъединицы молекулы неорганической пиррофосфатазы. Тонкими линиями показаны водородные связи между атомами главной цепи

Начиная с остатка Ala⁹ цепь поворачивает внутрь молекулы, образуя петлю, включающую в себя остатки 9—12. Остатки 11—13 находятся в вытянутой конформации. При остатке Leu¹³, боковая группа которого обращена в сторону растворителя, полипептидная цепь разворачивается в направлении, параллельном участку β1. Участок цепи 13—22 (β2) находится в β-конформации, формируя антипараллельную пару β1/β2. Остатки 23—25, также находящиеся в β-конформации (β3), продолжают формирование β-слоя, однако при остатке Pro²⁵ полипептидная цепь разворачивается в перпендикулярном к нему направлении. β-Слой, составленный цепями

Элементы вторичной структуры в одиночной субъединице молекулы
неорганической пирофосфатазы

Тип структуры	Обозначение элементов	Первый остаток	Последний остаток	Количество остатков
β-Цепи	β1	Tyr ²	Gly ⁸	7
	β2	Leu ¹³	Asp ²²	10
	β3	Gly ²³	Pro ²⁵	3
	β4	Asn ⁴¹	Ile ⁴⁹	9
	β5	Asn ⁵⁴	Ile ⁵⁹	6
	β6	Leu ⁶⁵	Gln ⁷⁰	6
	β7	Arg ⁷⁷	Pro ⁸⁴	8
	β8	Gly ⁸⁷	Ile ⁸⁹	3
	β9	His ⁹⁰	Pro ⁹⁶	7
	β10	Gln ⁹⁷	Asp ¹⁰¹	5
	β11	Asn ¹¹⁵	Glu ¹²⁵	11
	β12	Ile ¹²⁷	Thr ¹³⁰	4
	β13	Gln ¹³²	Leu ¹³⁹	8
	β14	Gly ¹⁴⁰	Glu ¹⁴⁷	8
	β15	Gly ¹⁴⁸	Lys ¹⁵³	6
	β16	Val ¹⁵⁴	Asp ¹⁵⁸	5
	β17	Glu ¹⁹⁹	Ala ²⁰³	5
	β18	Ala ²⁰⁸	Asn ²¹⁰	3
	β19	Asp ²⁷⁶	Ile ²⁸¹	6
α-Спирали	α1	Asp ¹⁶⁹	Phe ¹⁷⁷	9
	α2	Gly ¹⁷⁹	Ile ¹⁹³	15
	α3	Asn ²¹⁰	Ala ²³⁰	21
	α4	Ser ²⁵³	Ile ²⁶⁰	8
Участки реверсивных поворотов	28–31, 33–36, 36–39, 50–53, 53–55, 65–68, 83–86, 129–132, 146–149, 158–161, 164–167, 193–196, 204–207, 230–233, 234–237, 243–246, 246–249, 249–252, 272–275			

β1, β2 и β3, расположен на поверхности молекулы, но частично прикрыт спиралью α4 (остатки 253–260) и участком 261–264.

Кроме водородных связей, которые формируют β-структуру, в этой области возможно образование дополнительных связей между боковыми группами остатков Arg⁵ и Glu²⁰, Lys¹⁶ и Tyr¹⁸, Lys²⁴ и Asp²⁵⁸, а также между атомами водорода остатков Arg⁵ и Ser²⁵⁷, с одной стороны, и атомами кислорода основной цепи остатков Ile²⁶⁰ и Pro²⁵ — с другой. Учитывая относительно низкий уровень разрешения синтеза электронной плотности, на основании которого строилась атомная модель, можно предположить, что наши представления о деталях строения неорганической пирофосфатазы и системе водородных связей могут измениться при уточнении структуры белка при более высоком разрешении.

Фрагмент 25–28 вытянутый, а на участке 28–40 образуются три шпильки. Боковые группы остатков Phe³⁹, His³⁰ первой шпильки, а также остаток Pro¹¹⁷ ограничивают полость активного центра и расположены с некоторым сдвигом в параллельных плоскостях на расстоянии ~4 Å друг от друга. Вторая β-шпилька (33–36) прикрывает вход в цилиндрическую баррельную структуру (см. ниже), а третья (36–39) расположена на поверхности молекулы.

Начиная с остатка Asn⁴¹ формируется протяженный участок β-цепи (β4), включающий в себя фрагмент 41–49. Первый остаток этой цепи (Asn⁴¹) находится на поверхности молекулы, а последние два — Glu⁴⁸ и Ile⁴⁹ — входят в состав задней стенки активного центра и расположены в ее левой части (рис. 1). Участок 49–56 имеет U-образную форму. Ее вет-

ви образованы остатками 49–51 и 54–56. В этом районе сформированы две следующие друг за другом шпильки — β (остатки 50–53) и γ (остатки 53–55), а фрагмент 54–59 находится в β -конформации ($\beta 5$). Весь этот участок полипептидной цепи (48–59) участвует в формировании задней и нижней стенки полости активного центра, причем боковые группы остатков Arg⁵¹ и Trp⁵² направлены в сторону соседней субъединицы и находятся в зоне контакта. Плоскости гуанидиновой группы и имидазольного кольца этих остатков расположены параллельно друг другу.

Фрагмент 60–65 образует петлю на поверхности молекулы, здесь локализована β -шпилька (62–65). Следующий участок 65–70 ($\beta 6$) имеет β -конформацию, нарушенную при остатке Pro⁶⁷. Сегменты $\beta 5$ и $\beta 6$ представляют собой антипараллельную пару, находящуюся вблизи пары $\beta 1/\beta 2$. Однако эти пары β -цепей удалены друг от друга и между ними не образуется водородных связей. На участке 71–77 снова образуется петля, которая расположена у входа в активный центр. Здесь установлены две водородные связи: CO(Gln⁷⁰)...NH(Arg⁷⁷) и CO(Asn⁷¹)...NH(Lys⁷⁵). Эта петля содержит много полярных остатков и полностью окружена растворителем. Боковые группы остатков Lys⁵⁶, Glu⁵⁸, Gln⁷⁰, Arg⁷⁷, направленные в сторону места связывания иона уранила, вместе с остатком Thr⁷² в нативной структуре могут участвовать в образовании группы солевых мостиков.

Фрагмент 77–84 представляет собой искаженную β -цепь ($\beta 7$), которая в начальной части образует несколько водородных связей с трипептидом 54–56, а в концевой — с участком 278–281.

Фрагмент 77–82 участвует в формировании в полости активного центра, причем остатки Arg⁷⁷, Val⁷⁹ направлены внутрь этой полости. Единственный на субъединицу молекулы белка остаток цистеина (Cys⁸²) примыкает к полости активного центра, контактируя с остатком Trp¹⁸⁷, который в свою очередь сближен с остатками Phe¹⁸⁸, Tyr⁸⁸ и Tyr¹⁹¹, OH-группы которых направлены в сторону связывания ионов металлов.

На участке 83–86 образуется петля, входящая в зону контакта между субъединицами. При остатке Gly⁸⁷ формируется короткий изолированный β -сегмент (87–90) ($\beta 8$), который размещается в стенке полости активного центра. Здесь полипептидная цепь круто поворачивает влево и доходит до цилиндрической структуры. С остатка His⁹⁰ начинается новая β -цепь, продолжающаяся до остатка Pro⁹⁶ ($\beta 9$), а далее полипептидная цепь поворачивает под прямым углом вправо и вниз, образуя несколько искаженную β -цепь ($\beta 10$), включающую в себя остатки 97–101. Ее контакты с соседними элементами структуры являются большей частью ван-дер-ваальсовыми. Атомы основной цепи на этом участке образуют три водородные связи: NH(Trp⁹⁹)...CO(Thr²²¹), CO(Pro¹⁰²)...NH(Gly¹¹³) и NH(Glu¹⁰⁰)...CO(Asn¹¹⁶). Большая часть фрагмента 87–102 участвует в формировании полости активного центра, охватывая ее снизу (87–91), с внутренней левой стороны (91–94) и сверху (99–102).

Участок 102–114 нерегулярен, он образует на поверхности молекулы петлю, начало и конец которой зафиксированы водородными связями: CO(Pro¹⁰²)...NH(Gly¹¹³), CO(Val¹¹²)...NH(Thr¹⁵⁰) и NH(Val¹¹²)...CO(Thr¹⁰⁹). Конформация этой петли различна для двух субъединиц пиррофосфатазы. Это, скорее всего, обусловлено различным окружением субъединиц в кристалле соседними молекулами.

Фрагмент 115–125 имеет вытянутую β -структуру ($\beta 11$) и ионизирует справа налево всю субъединицу. Эта β -цепь, соседствуя с цепями $\beta 9$ и $\beta 16$, входит частично в состав цилиндрической структуры и внутренней стенки полости активного центра (см. ниже). Расположенный здесь остаток Asp¹¹⁹ входит в координационную сферу иона уранила (табл. 2) и, кроме того, в нативной структуре может взаимодействовать с полярными остатками Tyr⁸², Glu¹⁰⁰, Asp¹⁵¹, Lys¹⁵³. Цепь полярных взаимодействий может быть расширена, поскольку вблизи остатка Asp¹⁵¹ находится остаток Asp¹⁴⁴, контактирующий с остатками Asn¹¹⁶, Glu¹⁴⁹ и остатком Glu¹⁴⁷, входящим в контакт с растворителем. Возможно также образование водородной связи между боковой группой остатка Glu¹⁰⁰ и NH-группой и атомом

№ Trp¹⁵². Последний остаток этой β-цепи (Glu¹²⁵) вместе с остатком Thr¹²⁶ входит в зону контакта между субъединицами молекулы.

Фрагменты 127—130 (β12) и 132—139 (β13) — регулярные β-цепи, образующие на участке 129—132 β-шпильку, причем тетрапептид 127—130 вытянут вдоль цепочки 48—51, а участок 132—135 — вдоль пентапептида 44—48.

Фрагмент 139—147 (β14) представляет собой β-цепь, регулярность которой нарушается лишь на С-конце. Антипараллельно этому участку расположены фрагмент 148—154 (β15), с одной стороны, и участки 199—203

Таблица 2

Аминокислотные остатки активного центра неорганической пирофосфатазы, которые могут участвовать в связывании ионов металлов

Ион	Место связывания	Аминокислотные остатки
UO ₂ ²⁺	U ₁	Glu ⁴⁸ , Glu ⁵⁸ , Asn ¹¹⁶ , Asp ¹¹⁹
UO ₂ ²⁺	U ₃	Tyr ⁹² , Asp ¹⁴⁶ , Glu ¹⁴⁷ , Glu ¹⁴⁹ , Tyr ¹⁹¹ , Asn ²⁰⁰
UO ₂ ²⁺	U ₇	Glu ⁵⁸ , Gln ⁷⁰ , Asn ¹¹⁶
Mg ²⁺ (Tb ³⁺)	MO	Tyr ⁸⁸ , Tyr ⁹² , Asp ¹⁵¹ , Tyr ¹⁹¹ , Asp ¹¹⁹

и 208—210 — с другой. Остатки 146—149 формируют β-шпильку, которая вместе с остатками 143—146 и 150—153 цепей β14 и β15 входит в состав стенки полости активного центра. Расположенные здесь остатки Glu¹⁴⁷ и Glu¹⁴⁹, о которых уже говорилось, а также остатки Asp¹⁴⁶ и Asn²⁰⁰ могут участвовать в связывании иона уранила (табл. 2). Далее цепь несколько изгибается, оставаясь на участке 154—158 регулярной β-цепью (β16), входящей в состав цилиндрической структуры. Остатки 158—161 формируют β-шпильку. Далее полипептидная цепь нерегулярна вплоть до остатка Asn¹⁶⁸; создавая в средней части β-шпильку (164—167), она несколько удаляется от центра молекулы, образуя полость, в которую входят гидрофобные остатки.

До остатка Asn¹⁶⁸ на всем протяжении полипептидной цепи не установлено ни одного спирального участка. Первая α-спираль (α1) формируется на участке 169—177, после которого следует остаток Pro¹⁷⁸, выходящий из спиральной конформации. Начиная с остатка Gly¹⁷⁹ перпендикулярно к спирали α1 формируется вторая α-спираль (α2), состоящая из 15 остатков. Спираль α2 участвует в образовании передней стенки активного центра (рис. 2), а остаток Tyr¹⁹¹, как уже говорилось, направлен к месту связывания ионов Mg²⁺ (Tb³⁺) и UO₂²⁺. Остатки Phe¹⁷⁷ и Pro¹⁷⁸ этого участка входят в зону контакта между субъединицами. Остаток Pro¹⁹⁴ входит в состав β-шпильки, образованной остатками 193—196 (остаток Pe¹⁹³ одновременно является последним остатком второй α-спирали).

Фрагмент 199—210 расположен на поверхности молекулы, он состоит из двух β-цепей (17 и 18), между которыми встроена β-шпилька (204—207). Именно наличие этой шпильки заставляет разбить полипептидную цепь на две β-цепи, составляющие продолжение одна другой и идущие вдоль цепи β14.

Участок 210—230 представляет собой самую длинную в структуре неорганической пирофосфатазы α-спираль (α3), прикрывающую вход в цилиндрическую структуру (см. ниже). Карбонильная группа остатка Thr²²¹ этой спирали образует вилочную водородную связь — внутриспиральную с NH-группой остатка Trp²²⁵ — и указанную выше с NH-группой остатка Trp⁹⁹. Это приводит к нарушению регулярности α-спирали, которая с остатка His²²² несколько меняет свое направление. Образованию этого излома может способствовать также водородная связь между группой СО остатка Pe²¹⁸ и группой ОН остатка Thr²²¹. Непосредственно после спирали α3 формируются две идущие друг за другом β-шпильки (остатки 230—233 и 234—237), за которыми следует протяженный участок цепи,

включающий в себя остатки 237–244, после которого снова друг за другом идут три β -шпильки (остатки 243–246, 246–249 и 249–252), переходящие в короткую спираль α_4 (остатки 253–260). Первые три остатка α_4 -спирали находятся в конформации Z_{10} , затем следует виток α -спирали. Фрагмент 262–268 проходит вдоль N-концевой части полипептидной цепи, образуя с ней ряд водородных связей. С-Концевой участок молекулы (остатки 270–281) включает в себя β -шпильку (остатки 272–275) и следующую за ней β -цепь (β_{19}), которая примыкает к участку 77–84, образуя с ним ряд водородных связей. Последние четыре остатка полипептидной цепи в синтезе не проявляются и поэтому не локализованы.

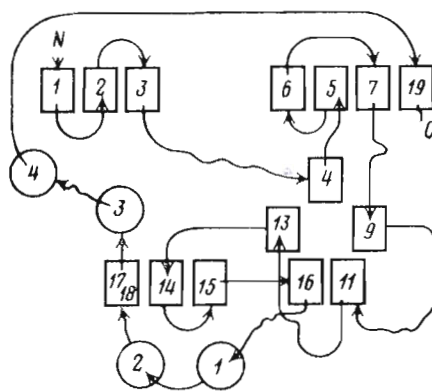


Рис. 3. Топологическая схема строения субъединицы молекулы неорганической пирофосфатазы. Прямоугольниками показаны β -цепи, кружками — α -спиральные структуры

Топологическая схема строения субъединицы неорганической пирофосфатазы представлена на рис. 3. Основу структуры неорганической пирофосфатазы составляют слой из β -цепей 17, 18, 14 и 15 (в направлении с внешней стороны субъединицы) и баррельная структура, причем β -цепи 11, 9, 4, 13 и 16, входящие в нее, находятся в продолжении указанного слоя. Можно было бы выделить β -слой, скрученный против часовой стрелки и состоящий из 8 цепей (цепи 17 и 18, идущие в одном направлении, как указывалось выше, разделены β -шпилькой), однако между соседними цепями β_{15} и β_{11} не установлено водородных связей. Если в состав этого слоя включить также участок β_{16} , завершающий формирование баррельной структуры и являющийся продолжением участка β_{15} , то выделенный таким образом β -слой замкнется в средней части сам на себя (рис. 1).

Баррельная (цилиндрическая) структура (рис. 4) расположена в левой части субъединицы. В ее формировании участвуют β -цепи 16, 11, 9, 4 и 13. Все цепи, за исключением 16 и 11, расположены антипараллельно. Вход в эту структуру, внутренняя часть которой заполнена исключительно гидрофобными остатками, прикрыт спиралью α_3 и шпилькой 33–36.

Слой, образованный антипараллельными β -цепями 1, 2 и 3, расположен в задней верхней части субъединицы. Другой β -слой, сформированный цепями β_6 , β_5 , β_7 , β_{19} , является как бы продолжением предыдущего, однако между соседними цепями β_2 и β_6 отсутствуют водородные связи вследствие их удаленности друг от друга (рис. 1). Во втором β -слое цепь β_7 образует водородные связи с цепью β_5 только в своей начальной части, а с цепью β_{19} — только в конечной (рис. 2). Фрагменты полипептидной цепи, имеющие β -конформацию, в основном участвуют в формировании β -слоев, однако есть изолированные β -цепи (β_8 , β_{10} и β_{12}) и вытянутые участки цепи (остатки 25–28, 237–244 и 262–268), не имеющие регулярной структуры. Все α -спирали располагаются на поверхности молекулы. Одна из них участвует в формировании передней стенки полости активного центра, другая (α_3) в N-концевой части прикрывает вход в баррельную структуру, а C-концевая часть расположена в верхней части молекулы, прикрывая вместе с нерегулярной частью 231–153 полость, внутри которой расположены гидрофобные остатки.

Согласно работе [11], структура неорганической пирофосфатазы относится к типу $(\alpha+\beta)$. В наибольшей степени в ней представлены β -структуры, чередующиеся с нерегулярными участками; α -спирали развиты значительно слабее — в них сосредоточены лишь 53 аминокислотных остатка. Наличие в структуре молекулы белка большого количества нерегулярных элементов, по-видимому, существенно для функционирования пирофосфатазы. Петлеобразные участки, расположенные у входа в полость активного

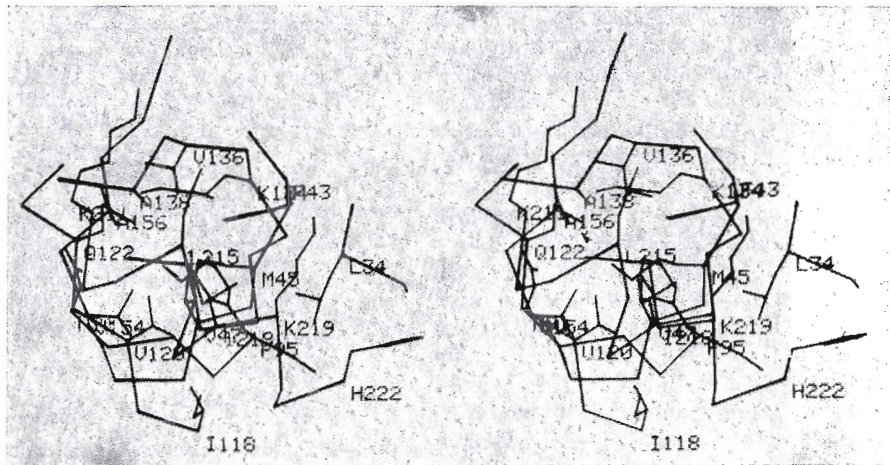


Рис. 4. Стереизображение баррельной (цилиндрической) структуры в молекуле неорганической пирофосфатазы. В главной цепи указаны только C_{α} -атомы

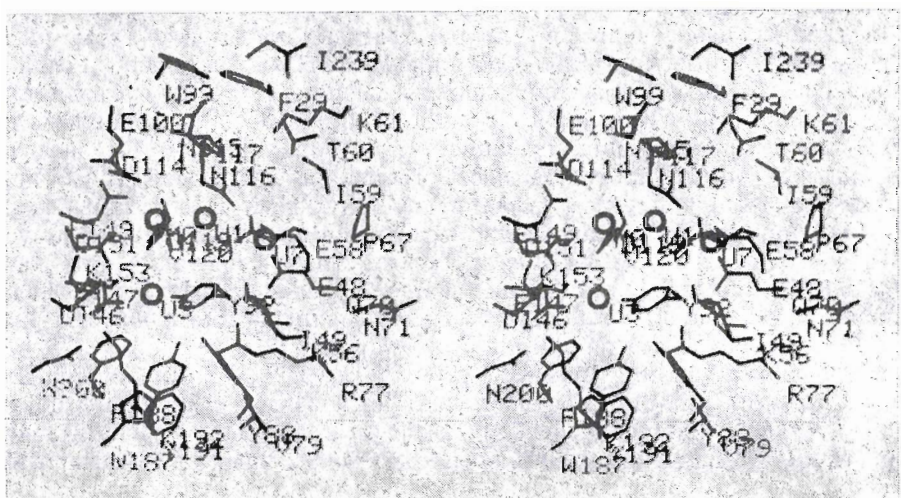


Рис. 5. Стереизображение активного центра неорганической пирофосфатазы. Кружками указаны места связывания ионов металлов (U, U_3 и U_7 — ионов уранила, MO — ионов магния и тербия)

центра (остатки 70–77 и 193–197) и формирующие ее верхнюю и дальнюю стенки (остатки 231–238 и 48–57 соответственно), могут быть подвижными элементами молекулы. Их контакты с соседствующими участками структуры осуществляются в основном за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий. В наибольшей степени может быть подвижна петля 70–77, включающая в себя остаток Arg⁷⁷, который участвует в акте катализа [12]. Как уже говорилось, эта петля полностью доступна воздействию внешней среды.

Для структуры неорганической пирофосфатазы чрезвычайно характерно образование *основной цепью* полостей, сообщающихся в ряде случаев с полостью активного центра. Ниже приводится их описание.

Полость активного центра (полость 1), если судить по полипептидному остову (рис. 1), представляет собой полусферу диаметром ~25 Å. Лишь левая, внутренняя, и передняя, внешняя, стенки образованы регулярными структурами. Первая представлена β -цепями 4, 9, 11, вторая — β -цепями 15, 14, 17, 18 и α -спиралью (рис. 1). Задняя, внутренняя, стенка сформирована участком 48–54 (U-образная петля) и петлей 70–77, расположенной у входа в активный центр. Сверху активный центр прикрыт не-

регулярным участком 114–117 и остатками Phe²⁹, Trp⁹⁹, Pro¹¹⁷, Ile²³⁹, входящими в состав полости 2 (см. ниже), а также полярными боковыми группами остатков Asn¹¹⁵ и Thr⁶⁰. Аминокислотные остатки, входящие в состав активного центра (рис. 5), имеют преимущественно полярный характер. На задней стенке полости активного центра расположены остатки Tyr⁹², обращенный своим гидроксилом в сторону Lys¹⁵³, и Asp¹¹⁹, Val¹²⁰, Ile⁴⁹. Сверху непосредственно к области связывания субстрата подходят остатки Asn¹¹⁶, Asn¹¹⁵, Glu¹⁰⁰, Asp¹¹⁴, Pro¹¹⁷. В правой части полости активного центра расположены остатки Arg⁷⁷, Gln⁷⁰, Lys⁵⁶, Glu⁴⁶, Glu⁵⁸, Ile⁵⁹, Thr⁶⁰, Pro⁶⁷, в левой — остатки Asn²⁰⁰, Asp¹⁴⁶, Glu¹⁴⁷, Glu¹⁴⁹, Asp¹⁵¹, Lys¹⁵³. Остатки Tyr³⁸, Val⁷⁹, Phe¹⁸⁸, Trp¹⁸⁷, Tyr¹⁹¹, Lys¹⁹² лежат в нижней части полости.

Активный центр был локализован еще на предварительной стадии исследования структуры неорганической пирофосфатазы при низком разрешении, по данным структуры комплексов белка с ионами UO_2^{2+} , Mg^{2+} и Tb^{3+} , которые связываются в активном центре молекулы [13, 14], и пирофосфатом кальция. При получении трех последних комплексов использовалась методика совместной кристаллизации белка с соответствующими ионами. В каждой субъединице нами обнаружено по одному месту связывания для ионов Mg^{2+} и Tb^{3+} (вместо двух при исследовании в растворе [4–8, 13]). Пирофосфат кальция, как выяснилось, связывается только в одной субъединице. Из рассмотрения атомной модели следует, что в связывании ионов уранила могут участвовать остатки (табл. 2) Asn¹¹⁶, Asp¹¹⁹, Glu⁴⁶ и Glu⁵⁸ (U_1 — основное место присоединения), Asp¹⁴⁶, Glu¹⁴⁷, Glu¹⁴⁹, Asn²⁰⁰, Tyr¹⁹¹ (U_3 — второе место связывания), Glu⁵⁸, Gln⁷⁰, Asn¹¹⁶ (U_7 — третье место с наиболее низким коэффициентом заполнения). Ионы Mg^{2+} и Tb^{3+} (их места присоединения — MO — совпадают) могут быть связаны при участии остатков Tyr⁸⁸, Tyr⁹², Tyr¹⁹¹, Asp¹⁵¹. Два места связывания ионов металлов (U_1 и MO) расположены в полости активного центра глубже, чем два других (U_3 и U_7). Место связывания пирофосфата кальция расположено между местами связывания ионов уранила U_1 и U_3 и включает в себя место связывания MO (рис. 5). Такая схема предполагает, что единственное место связывания ионов Mg^{2+} , обладающее, вероятно, наибольшим сродством, пространственно совпадает с местом связывания иона Mg^{2+} в магний-пирофосфатном субстратном комплексе.

В приведенной схеме связывания ионов металлов наиболее существенно то, что большинство карбоксильных групп, расположенных в активном центре, может участвовать в присоединении ионов металлов. В результате связывания этих ионов может не остаться свободных карбоксильных групп, препятствующих связыванию отрицательно заряженной пирофосфатной группы. Мы предполагаем, что место связывания иона кальция, входящего в состав субстратного комплекса с пирофосфатом, совпадает с местом связывания магния. Из трех остатков тирозина, которые могли бы участвовать в связывании ионов Mg^{2+} (Tb^{3+}), скорее всего, один или два остаются свободными и участвуют в связывании пирофосфата наряду с остатками Lys⁵⁶, Arg⁷⁷, Lys¹⁹², расположенными в этом районе в структуре нативной пирофосфатазы.

Полость 2 расположена непосредственно над полостью активного центра и сообщается с ней. Она сформирована в основном нерегулярными участками полипептидной цепи, 27–33, 231–251 и C-концевым участком $\alpha 3$ -спирали. На границе с полостью активного центра расположены остатки Ile⁷⁹, Ala³⁴, Pro¹¹⁷, Trp²²⁵ и Ile²³⁹. Кроме них в состав полости входят Trp⁹⁹, Phe²⁹, Leu²²⁸, Ile²²⁹, Asn²⁴³, His³⁰, Leu⁶⁵ и расположенные на периферии молекулы остатки Lys²²⁶, His²²², Gln⁹⁷, Thr²⁴⁵, Leu²⁴⁶, Tyr²⁵², Thr²⁵¹, Leu²⁴¹, Lys²³⁷, Ser²³⁴. Здесь возможно образование большого числа водородных связей, среди которых следует выделить экранированную водородную связь между боковыми группами остатков His³⁰ и Trp²²⁵.

Полость 3 находится непосредственно под полостью 2. Она вытянута вдоль β -слоя, включающего в себя участки $\beta 1$ и $\beta 2$, которые ограничивают полость 3 с внешней стороны молекулы. В левой части эта полость расширяется, в результате чего в центре остается незаполненное боковыми груп-

пами белка свободное пространство. Здесь поверхность ниши выстлана остатками Val¹³³, Val¹⁴⁶, Pro⁹⁶, Ile³², Pro³³, Ile¹⁹, Val⁴⁶, Ala³⁶, Ser²⁷, Asn⁴⁴ и Thr²⁴⁵. Полость 3 остатками Ile⁵⁹, Pro⁶⁷, Ala⁹⁴ отделена от полости активного центра.

Полость 4 внутри баррельной (цилиндрической) структуры заполнена исключительно гидрофобными остатками: Val¹⁷, Ala¹²⁸, Ala¹³⁸, Met⁴⁵, Val¹²⁰, Val¹⁵⁴, Ile¹¹⁸, Ile²¹⁸, Phe⁹⁵, Leu³⁴ и Phe⁴³. Они экранированы от растворителя остатками His²²², Lys²¹⁹, Lys²¹¹, Leu²¹⁵.

Полость 5 находится в передней части молекулы. В образовании этой полости участвуют N-концевая часть α 3-спирали, β -цепи 14, 15, 17, 18 и петлеобразный участок полипептидной цепи 102–114, прикрывающей полость справа. Остатки, расположенные между α -спиралью и петлеобразной структурой (Tyr²¹³, Glu²⁰⁷, Lys²⁰⁹, Phe²⁰⁴, Glu¹⁰⁸, His¹⁰⁶, Ser¹⁰⁵, Val¹⁰⁴, Ser²²⁴ и Glu²²⁰), полностью доступны для молекул растворителя. Боковые группы остатков Trp⁹⁹, Ser²²⁴ и Leu²²⁸ отделяют данную полость от полости 2. Внутри полости имеются как гидрофильные, так и гидрофобные остатки: Trp¹⁵², Ile¹⁷, Ile¹¹⁸, Thr²²¹, Thr¹⁰⁹, Thr¹⁵⁰, Ala¹⁴³ и Phe²⁰⁴. На границе с полостью активного центра расположены остатки Glu¹⁰⁰, Asp¹¹⁴, Asp¹¹⁹ и Asp¹⁵¹.

Непосредственно под баррельной структурой и спиралью α 2 находится следующая, шестая полость, лишь частично прикрытая полипептидной цепью. Остатки здесь упакованы неплотно, и в нижней части эта полость контактирует с соседней субъединицей на участке, который расположен над ее активным центром. В верхней части этой полости образуется свободное пространство, которое остатки His⁹⁰, Leu¹²¹, Phe¹⁸⁸, Lys¹⁵³ и Leu¹⁴⁴ отделяют от полости активного центра. Здесь помещаются также остатки Met¹⁴² (частично доступен для молекул растворителя), Phe²⁰², Ala²⁰⁸, Ile¹⁷⁰, Ile¹⁵⁵, Leu¹⁸¹, Ile¹²³, Ile¹⁵⁷, Thr¹⁸⁴. В зоне контакта двух субъединиц белка присутствуют боковые группы остатков Phe¹⁷⁷, Tyr¹⁷⁶, Leu¹⁸⁰, Leu¹⁶³, Pro¹⁶², Lys¹⁶⁶, Glu¹²⁵, Trp^{278*}, Phe^{280*}, Phe^{83*}.

В области контакта между субъединицами непосредственно у молекулярной оси второго порядка находятся четыре ароматические боковые группы, плоскости которых параллельны друг другу: остатки Trp⁵², His^{86*}, His⁸⁶ и Trp^{52*}. К остаткам триптофана приближен остаток Arg⁵¹, гуанидиновая группа которого расположена почти параллельно имидазольным кольцам. Далее, в направлении, перпендикулярном молекулярной оси, помещаются остаток Ile¹²⁷ и участок полипептидной цепи, несущей остатки Glu¹²⁵ и Thr¹²⁶. Эти остатки сближены с остатками Lys^{277*}, Lys^{273*} и Asp^{276*}, причем аналогичные остатки второй субъединицы расположены симметрично. В пространство между остатками Trp²⁷⁸, Phe²⁸⁰, Phe⁸³ и Pro⁸⁴ входят остатки Phe^{177*} и Leu^{180*}.

Неравноценность субъединиц молекулы. Каждая из двух субъединиц неорганической пирофосфатазы способна выполнять каталитическую функцию в отдельности [15], причем при объединении их в димерную молекулу скорость реакции не повышается. В то же время в ряде реакций субъединицы фермента ведут себя по-разному [16, 17].

В нативной структуре неорганической пирофосфатазы молекулярная симметрия выполняется достаточно полно, и только на участке 102–114 распределение электронной плотности и ход полипептидной цепи были различны. Различия в связывании ионов металлов отдельными субъединицами должны проявиться в строении соответствующих комплексов, однако возможности метода рентгеноструктурного анализа в установлении этих различий несколько ограничены. Для этого необходимо, чтобы каждая из двух различающихся субъединиц занимала «свое» положение в кристаллической ячейке. Между тем кристаллизация не всегда проходит столь избирательно, поскольку изменения в строении субъединиц могут не повлиять на систему межмолекулярных контактов. Но при исследовании структуры неорганической пирофосфатазы нами были установлены различия в степени связывания разными субъединицами [10] молекулы

* Звездочкой здесь и далее отмечены аминокислотные остатки, принадлежащие второй субъединице молекулы неорганической пирофосфатазы.

n-хлормеркурибензолсульфофокислоты (PCMBS), модифицирующей SH-группу цистеина. Были установлены два основных места присоединения, по одному на каждую субъединицу, причем коэффициент заполнения для одной субъединицы был в 1,5 раза больше, чем для другой. Естественно было предположить, что это различие связано с доступностью субъединиц в кристалле, однако этот результат был воспроизведен и для кристаллов, которые были получены после предварительной модификации белка в растворе. По-видимому, в этом случае существовала некоторая степень избирательности в расположении субъединиц при образовании кристаллов.

Для комплекса с пирофосфатом кальция, полученного сокристаллизацией, такая избирательность проявилась более четко. При исследовании структуры этого комплекса по разностным синтезам с разрешением 5 Å был установлен один пик, указывающий на присоединение аналога субстрата лишь к одной из субъединиц.

В молекуле неорганической пирофосфатазы каждая из двух полипептидных цепей формирует «свою» структуру и не участвует в образовании другой субъединицы. Это обстоятельство помогает объяснить возможность их раздельного функционирования. С другой стороны, полученные данные по пространственной структуре белка не позволяют установить детальный механизм взаимного влияния субъединиц в процессе каталитического акта. Скорее всего, передача информации происходит через систему стекингов-взаимодействий между остатками Arg⁵¹, Trp⁵², His⁸⁰, His^{86*}, Trp^{32*}, Arg^{51*}. Остаток Trp⁸⁸, гидроксильная группа которого направлена к месту связывания ионов Mg²⁺ (Tb³⁺) и пирофосфата, расположен вблизи остатка His⁸⁶. Между ними находится остаток Gly⁸⁷, который может обеспечить конформационную подвижность полипептидной цепи на этом участке.

Экспериментальная часть

Методика получения кристаллов неорганической пирофосфатазы (пространственная группа *P2*₁, параметры ячейки *a* 52,2, *b* 70,3, *c* 95,5 Å, γ 99,6°, *Z*2) и методика измерения интенсивностей рентгеновских отражений на автоматическом дифрактометре Syntex-P2, описаны нами ранее [18]. Время жизни кристаллов неорганической пирофосфатазы при рентгеновском облучении невелико (60 ч для нативного белка и 45 ч для его тяжелоатомных производных), поэтому при измерении интенсивностей с разрешением 3,0 Å использовали довольно большое количество кристаллов. Съемку вели по сферическим слоям обратного пространства с некоторым перекрытием для разных кристаллов. Общие рефлексy были использованы для сведения экспериментальных данных, полученных на разных кристаллах нативного белка, к общей шкале. Интенсивности отражений тяжелоатомных производных приводили к шкале белка для каждого кристалла в отдельности, что позволяло автоматически учесть различие в температурных факторах.

Уточнение параметров тяжелых атомов проводили вначале при разрешении 5,0 Å. Для выявления дополнительных мест связывания тяжелых атомов циклы уточнения сопровождали расчетом разностных и нулевых синтезов Фурье с коэффициентами $(|F_{\text{БТ}}| - |F_{\text{Б}}|) \exp(i\varphi_{\text{Б}})$ и $(|F_{\text{БТ}}| - |D_{\text{БТ}}|) \exp(i\varphi_{\text{БТ}})$, где $|F_{\text{Б}}|$, $|F_{\text{БТ}}|$ — экспериментальные, а $D_{\text{БТ}}$ — расчетные структурные амплитуды белка и его тяжелоатомного производного, $\varphi_{\text{Б}}$ и $\varphi_{\text{БТ}}$ — значения фаз. По сравнению с ранее опубликованными данными локализовано пять дополнительных мест связывания для PCMBS-производного и одно — для уранильного. В зоне разрешения 5,0–3,0 Å уточнение проводили для каждого кристалла в отдельности. Разностные синтезы, рассчитанные по данным с разрешением 3,2 Å, не выявили других мест связывания тяжелых атомов. Результаты уточнения опубликованы ранее [10]. Средний показатель достоверности определения фаз $\bar{m} = 0,67$.

Синтез электронной плотности, рассчитанный по этим фазам, не дал возможности установить ход полипептидной цепи. Распределение электронной плотности в субъединицах молекулы оказалось сходным и подчинялось действию молекулярной оси симметрии второго порядка, положение кото-

Результаты уточнения фаз структурных факторов неорганической пиррофосфатазы, полученные по тяжелоатомным производным белка посредством усреднения электронной плотности молекулы.

Начальное значение среднего показателя достоверности фаз $\bar{m}=0,67$

№ цикла	R	$ D_{БТ} $	R_f	RMS	\bar{m}	$(\varphi_i - \varphi_{изо})$
1	1,0	2,27	0,22	4,14	0,82	31,19
2	0,67	3,4	0,18	3,5	0,83	39,36
3	0,65	3,29	0,18	3,52	0,82	43,0

Примечание: $R = \frac{2\sum |\rho_1 - \rho_2|}{\sum |\rho_1 + \rho_2|}$, где ρ_1 и ρ_2 — значения электронной плотности в симметрически эквивалентных точках молекулы; $R_f = \frac{\sum |D_{БТ} - F_{Б}|}{\sum F_{Б}}$; $RMS = \left(\frac{\sum (|D_{БТ} - F_{БТ}|)}{N} \right)^{1/2}$;

$\Delta\varphi_i - \varphi_{изо}$ — среднее значение изменения фаз по сравнению с изоморфными фазами, а $F_{Б}$, $F_{БТ}$ и $D_{БТ}$ — экспериментальные и расчетные структурные амплитуды белка и его тяжелоатомного производного, $N = 281j$ — число независимых рефлексов.

рой было предварительно установлено по координатам тяжелых атомов. Использование некристаллографической симметрии позволило улучшить качество фаз* и по заключительному синтезу Фурье установить ход полипептидной цепи и построить атомную модель белка.

На первом этапе было повторно определено положение молекулярной оси с использованием функции вращения. Расчет быстрой функции вращения Кроутера с использованием $|F_{Б}| > 1,1 \bar{F}_{Б}$, попадающих в интервал разрешения 5,0–40,0 Å, привел к значениям эйлеровых углов α , β и γ , равным соответственно 100, 71 и 80°. При этом молекулярная ось образует угол 35,5° с осью z кристалла, а ее проекция на плоскость xy — угол в 100° с осью x , что отличалось от данных, полученных по координатам двух основных мест присоединения тяжелых атомов производных белка с РСМБС и $K_2Pt(NO_2)_4$ (37,5 и 102,5° соответственно). Расчет пробных сечений электронной плотности, перпендикулярных возможным направлениям молекулярной оси, показал, однако, что данные, полученные по координатам тяжелых атомов, как и следовало ожидать, лучше отвечают распределению электронной плотности.

Положение молекулярной оси уточнялось методом проб. Для этого при разных положениях оси рассчитывались значения $R = 2\sum |\rho_1 - \rho_2| / \sum |\rho_1 + \rho_2|$, где ρ_1 и ρ_2 — значения электронной плотности в точках, связанных молекулярной симметрией и заведомо попадающих в область расположения молекулы. Минимуму значения соответствовала точка с координатами x 36,65, y 80,43, z 14,32 Å, выбранная в качестве начала координат молекулярной ячейки. По этим данным были выполнены три цикла уточнения фаз (табл. 3). Каждый цикл включал в себя следующие этапы:

1) расчет синтеза электронной плотности с шагом 0,75 Å вдоль осей ячейки;

2) усреднение электронной плотности в точках, связанных молекулярной осью;

3) расчет фаз посредством обратного фурье-преобразования усредненной электронной плотности. Значения электронной плотности вне границы молекулы принимались равными 0;

4) комбинирование фаз, полученных на этапе 3, с фазами предыдущего цикла.

Расчет синтеза электронной плотности был проведен по значениям фаз, полученным на этапе 2, так как им соответствовало лучшее значение $\bar{m} = 0,83$ (табл. 3).

* Все расчеты по определению структуры неорганической пиррофосфатазы выполнены по комплексу программ «Влапс» А. А. Вагина (Институт кристаллографии АН СССР).

Синтез электронной плотности был выполнен в виде сечений, перпендикулярных оси симметрии молекулы. Предварительно интерпретировались карты малого масштаба (3 см — 4 Å), по которым удалось установить ход полипептидной цепи и локализовать 279 из 285 аминокислотных остатков. Знание первичной структуры оказалось весьма существенным при интерпретации, так как по ходу цепи имелся ряд разрывов (они отвечали остаткам глицина), а фрагмент 100—112 был плохо выражен на синтезе. Этому участку соответствует петля, расположенная на поверхности молекулы, причем она ориентирована по-разному в субъединицах молекулы. Длительное время не удавалось интерпретировать весьма протянутый мощный пик, расположенный между первым и третьим местами связывания ионов уранила. Выяснилось, однако, что этот пик имеет небелковую природу и связан, по-видимому, с внедрением внутрь молекулы белка молекул растворителя, поскольку с этим пиком частично совпадало положение пирофосфата кальция, а также ионов Mg^{2+} и Tb^{3+} . Построение атомной модели на компараторе Ричардса не вызвало трудностей. Большинство остатков соответствовали максимумы электронной плотности. Как обычно, громоздкие боковые группы ароматических аминокислотных остатков служили реперами при построении модели. Удалось установить положение 281 аминокислотного остатка, начиная с N-конца. Четыре C-концевых остатка расположены на поверхности молекулы и обладают значительной подвижностью.

Координаты атомов молекулы неорганической пирофосфатазы, установленные по проволоочной модели и модифицированные по программе построения математической модели Даймонда [19], представлены в Международном банке белковых данных.

Авторы благодарят В. В. Махалдиани (Институт физиологии АН ГССР) за участие в эксперименте, А. А. Вагина и Л. В. Малинину (Институт кристаллографии АН СССР, Москва) за помощь в использовании программ, Т. Л. Шадрину (Институт кристаллографии АН СССР, Москва) за техническую помощь, а также сотрудника Института биохимии (Мюнхен, ФРГ) Дж. Ремингтона за помощь в интерпретации синтеза на участке 250—260.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bakuleva N. P., Nazarova T. I., Baykov A. A., Avaeva S. M.* FEBS Lett., 1981, v. 124, № 2, p. 245—247.
2. *Janson C. A., Degani C., Boyer P. D.* J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 10, p. 3743—3749.
3. *Cohen S. A., Sterner R., Keim P. S., Heinrikson R. L.* J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 2, p. 889—897.
4. *Rapoport T. A., Höhne W. E., Reich J. C., Heitmann P., Rapoport S. M.* Eur. J. Biochem., 1972, v. 26, № 2, p. 237—246.
5. *Braga E. A., Avaeva S. M.* FEBS Lett., 1972, v. 29, № 2, p. 251—255.
6. *Rapoport T. A., Höhne W. E., Heitmann P., Rapoport S. M.* Eur. J. Biochem., 1973, v. 33, № 2, p. 341—347.
7. *Höhne W. E., Rapoport T. A.* Eur. J. Biochem., 1973, v. 33, № 2, p. 323—331.
8. *Baykov A. A., Tam-Villoslado J. J., Avaeva S. M.* Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 569, № 2, p. 228—238.
9. *Bunick G., McKenna G. P., Searbrugh F. E., Uberbacher E. C., Voet D.* Acta crystallogr., 1978, v. B34, № 11, p. 3210—3215.
10. *Арутюнян Э. Г., Терзян С. С., Воронова А. А., Куранова И. П., Смирнова Е. А., Вайнштейн Б. К., Хёне В., Хансен Г.* Докл. АН СССР, 1981, т. 258, № 6, с. 1481—1485.
11. *Levitt M., Chothia C.* Nature, 1976, v. 261, № 5561, p. 552—557.
12. *Bond M. W., Chiu N. I., Cooperman B. S.* Biochemistry, 1980, v. 19, № 1, p. 94—102.
13. *Hansen G., Höhne W. E., Kuranova I. P.* Acta biol. med. Germ., 1982, v. 41, № 1, p. 23—30.
14. *Куранова И. П., Смирнова Е. А., Махалдиани В. В., Воронова А. А., Арутюнян Э. Г., Хёне В., Хансен Г.* Докл. АН СССР, 1981, т. 258, № 5, с. 1246—1250.
15. *Плаксина Е. А., Сергиенко Д. В., Склянкина В. А., Аваева С. М.* Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 357—364.
16. *Аваева С. М., Вакулева Н. П., Воробьева Н. Н., Кузнецов А. В., Мельник М. С., Назарова Т. И., Плаксина Е. А., Склянкина В. А.* Сб. тез. V Всес. биохим. съезда. Л.: 1979, т. 1, с. 25.

17. Плаксина Е. А., Солопанова Е. Ю., Сяго И. Е., Склянкина В. А., Аваева С. М. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 191–194.
18. Махалдиани В. В., Смирнова Е. А., Воронова А. А., Куранова И. П., Арутюнян Э. Г., Вайнштейн Б. К., Хёне В., Бинвальд Б., Хансен Г. Докл. АН СССР, 1978, т. 240, с. 1478.
19. Diamond R. Acta crystallogr., 1966, v. 21, № 2, p. 253–266.

Поступила в редакцию
13.III.1984

THE SPATIAL STRUCTURE OF INORGANIC PYROPHOSPHATASE FROM YEAST AT 3 Å RESOLUTION

TERZYAN S. S., VORONOVA A. A., SMIRNOVA E. A., KURANOVA I. P.,
NEKRASOV Yu. V., HARUTYUNYAN E. G., VAINSTEIN B. K.,
HÖHNE W. *, HANSEN G.*

Institute of Crystallography, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
** A. Humboldt University, Berlin*

The three-dimensional structure of inorganic pyrophosphatase which belongs to ($\alpha+\beta$) structure type is determined. The binding sites for Mg^{2+} , Tb^{3+} and Ca-pyrophosphate in the respective complexes were analyzed by a difference Fourier technique, the results indicating the presence of a pocket in the active site. The structure and the amino acid composition of the active site, as well as the amino acid residues involved in binding of the abovementioned ligands are described.