

УДК 577.15.024.У

МЕЖСУБЪЕДИНИЧНЫЙ КОНТАКТ В ЩЕЛОЧНЫХ ФОСФАТАЗАХ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И МЕХАНИЗМ ИХ ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ

А. А. Козленков, О. М. Полторак, Е. С. Чухрай

(кафедра физической химии)

Проведено сравнение аминокислотных последовательностей различных изоферментов щелочной фосфатазы. На его основе, с использованием данных по пространственной структуре изофермента из *Escherichia coli*, для изоферментов животного происхождения промоделирована структура субъединицы и проанализировано строение межсубъединичного контакта. Полученные результаты позволяют использовать данные о структуре фермента из *E. coli* для описания механизма термоинактивации щелочных фосфатаз животного происхождения.

Изучение механизмов термоинактивации ферментов – перспективная и важная область энзимологии. Как показывает практика, результаты экспериментов по термоинактивации ферментов, как правило, не удается объяснить в рамках простого одностадийного механизма. Примером может служить инактивация щелочной фосфатазы из разных источников. На основании экспериментальных данных для изоферментов щелочной фосфатазы животного происхождения был предложен механизм диссоциативной термоинактивации со скрытыми стадиями до потери активности [1]. Представляет большой интерес привлечение структурных данных по ферменту для описания механизма термоинактивации на более детальном уровне. В настоящее время такие данные получены лишь для бактериальной изоферментной формы щелочной фосфатазы из *Escherichia coli* [2] (рис. 1).

Причиной расщепления межсубъединичного контакта в несколько стадий может быть наличие в зоне контакта нескольких отдельных участков, вносящих наибольший вклад в энергию взаимодействия глобул. Подобная модель строения межсубъединичного контакта была подтверждена при изучении пространственной структуры фосфатазы из *E. coli* [3]. Число контактных участков, выделенных на основании структурных данных, совпало с минимальным числом скрытых стадий до потери активности, полученных из эксперимента по термоинактивации. Тем не менее подобное рассмотрение было не вполне корректным, так как структурные и кинетические данные относились к разным (хотя и родственным) изоферментным формам щелочной фосфатазы. Неясным оставался вопрос о том, насколько приложимы данные по структуре бактериального фермента к изоферментам животного происхождения.

Из литературы [4] известно, что аминокислотные последовательности ферментов животного происхожде-

ния высоко родственны друг другу, тогда как их сходство с бактериальными изоферментами не столь велико. Интересно, что одинаковые изоферменты щелочной фосфатазы разных организмов часто более сходны между собой, чем разные изоформы одного и того же организма (например, изоферменты кишечника и печени).

Для получения выводов о возможной пространственной структуре щелочных фосфатаз разного происхождения необходимо детальное сравнение их аминокислотных последовательностей (*sequence alignment*). С этой целью могут быть использованы специальные компьютерные программы. Для белков с не слишком высоким родством аминокислотных последовательностей (как в случае бактериальных и эукариотических щелочных фосфатаз) эта процедура довольно сложна и не всегда однозначна. Правильное ее проведение требует привлечения дополнительных данных, в том числе по пространственной структуре. Сравнение аминокислотных последовательностей некоторых щелочных фосфатаз приведено в работе [4], однако обнаруженные неточности побудили нас к проведению независимого исследования, причем количество взятых для сравнения различных изоферментов щелочной фосфатазы было увеличено вдвое. Это позволило более надежно выявить консервативные области в сравниваемых последовательностях. Особое внимание было уделено области межсубъединичного контакта.

Начальную часть процедуры сравнения последовательностей проводили с помощью программы AMPS (*Alignment of Multiple Protein Sequences*, [5]), любезно предоставленной Джефом Бартоном из лаборатории молекулярной биофизики в Оксфорде. Аминокислотные последовательности изоферментов щелочной фосфатазы были взяты из банка данных аминокислотных последовательностей белков SWISS-PROT [6]. На сле-



Рис. 1. Сравнение пространственных структур щелочных фосфатаз бактериального и животного происхождения. Черным цветом обозначены участки полипептидной цепи фермента *E. coli*, отсутствующие у ферментов животного происхождения. Кругом отмечены места вставок. Темно-серым цветом выделен β -слой. Участки межсубъединичного контакта обозначены римскими цифрами (показана одна субъединица симметричного димера щелочной фосфатазы *E. coli*)

дующей стадии проводили полную проверку и оптимизацию полученного результата с учетом имеющихся данных по пространственной структуре фермента из *E. coli*. Наибольшее внимание обращали на то, чтобы избежать нарушений во вторичной структуре. Необходимые делеции (исключенные участки последовательности) и вставки по возможности выносили в поверхностные участки молекулы, не входящие в главные вторичные структуры – β -слои и α -спирали. Конечный результат сравнения последовательностей щелочных фосфатаз в однобуквенных обозначениях для аминокислот приведен на рис. 2. Участки последовательностей, находящиеся на N-конце и (в случае изоферментов животного происхождения) на C-конце – сигнальные пептиды, отсутствующие в конечном нативном белке.

Пространственная структура щелочных фосфатаз

Как видно из рис. 1, основным “ядром”, стабилизирующим нативную пространственную структуру фермента из *E. coli*, является центральный β -слой, включающий 10 отдельных линейных участков (*strand*). Все они, за исключением участка *i*, параллельны. Другими важными элементами вторичной структуры являются спиральные участки, располагающиеся по бокам β -слоя, и малый β -слой в “верхнем” домене, стабилизирующий его структуру. Необходимым условием сходства пространственных структур должно быть значительное сходство последовательностей в областях, соответствующих вторичным структурам. Как показывают данные рис. 2, для щелочных фосфатаз это действительно так. Соответствующие вторичным структурам элементы последовательностей

9-1038



Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей щелочных фосфатаз из различных источников. Аминокислотные последовательности даны в однобуквенном коде. Консервативные остатки обозначены жирным шрифтом. Номера аминокислотных остатков в последовательности указаны для фермента *E. coli*. Белым треугольником обозначены аминокислотные остатки активного центра, темно-серым треугольником — остатки, участвующие в связывании магния, белым кружком — важнейшие остатки, участвующие в межсубъединичном взаимодействии, черным треугольником — потенциальные сайты гликозилирования (в ферментах эукариот). Изоферменты щелочной фосфатазы приготовлены из: печени крысы (LRAT), печени человека (LHUM), плаценты мыши (PMOU), кишечника крысы (IRAT), кишечника мыши (IMOU), плаценты человека (PHUM), кишечника человека (IHUM), кишечника быка (IBOV), *Escherichia coli* (ECOL).

Графическое представление результатов выполнено с помощью программы ALSRIPT [9].

ферментов эукариот в большинстве случаев хорошо выделяются по высокой гомологии с соответствующими участками последовательности фермента *E. coli*. Еще выше консервативность остатков в области активного центра.

Для оптимального соответствия между последовательностями щелочных фосфатаз необходимо допустить наличие вставок и пропущенных участков в ферментах животного происхождения по сравнению с ферментом *E. coli*. Выбор места для таких участков в каждом случае был обоснован с использованием пространственной структуры бактериального фермента. Практически все они находятся в поверхностных областях молекулы и не могут нарушить задаваемую вторичными структурами общую укладку полипептидной цепи. То же относится и к потенциальным сайтам гликозилирования (определяемым по последовательности Asn – xxx – Thr/Ser, где xxx – любая аминокислота). Можно сделать вывод, что структура изоферментов щелочной фосфатазы существенно различается лишь на участках, располагающихся на поверхности молекулы (рис. 1).

Строение межсубъединичного контакта

Участвующие в контакте субъединиц аминокислотные остатки можно разбить на две группы – остатки, взаимодействующие с другой глобулой пептидной группой, и остатки, боковая группа которых участвует в межбелковом взаимодействии. Для сохранения контактов первого рода в изоферменте с отличающейся аминокислотной последовательностью достаточно неизменности общей структуры глобулы на данном участке. Во втором случае природа боковой цепи играет более важную роль. Тем не менее и в этом случае достаточно приемлемыми могут считаться замены, существенно не изменяющие природу (неполярные, кислотные и основные остатки) и размер боковой цепи.

Как показывает сравнение аминокислотных последовательностей фосфатаз бактериального и животного происхождения, большое сходство последовательностей в области центрального β -слоя, а также на спиральных участках, обеспечивает сходство пространственной структуры в наиболее важных для каталитической функции частях молекулы. Для сравнения структуры межбелкового контакта существенно сохранение таких элементов вторичной структуры, как β -слой и соседние участки в “верхнем” домене, участки *B* и *J* главного β -слоя, α -спираль 55-65, и (на большей длине) петля 1-29. Важным моментом является сохранение в изоферментах животного происхождения антипараллельности отрезка *i* главного β -слоя, что выводит отрезки *B* и *J* из плоскости слоя и формирует в этой области отдельный контактный участок (II). Главные отличия в общей структуре межсубъеди-

ничного контакта у щелочных фосфатаз эукариот по сравнению с бактериальным ферментом – уменьшение длины петли 1-29 за счет делеций в областях 13 – 15 и 31 – 40 (что частично компенсируется более протяженными N- и C-концевыми участками), а также вставки в области верхнего домена. Эти вставочные последовательности (всего 35 остатков) должны увеличить размеры “верхней” части молекулы. Возможной биологической функцией этого участка является связывание некоторых ингибиторов, специфических для щелочных фосфатаз эукариот [7]. Ряд других вставок (делеций) одного или нескольких остатков вблизи контактного участка располагаются на поверхности молекулы и не способны повлиять на общую структуру контакта. Более сильные изменения в структуре возможны лишь в областях молекулы, удаленных как от контактного участка, так и от активного центра.

Важным фактором для рассмотрения межсубъединичного контакта является расположение дисульфидных связей и потенциальных сайтов гликозилирования в ферментах эукариот. Хотя в случае фосфатаз эукариот остатки Cys находятся в других частях молекулы, они не участвуют в образовании межсубъединичного контакта. N-гликозилирование также не должно влиять на взаимодействие субъединиц в димере (возможно, за исключением сайта во вставке после остатка 404).

Аминокислотные остатки, вносящие наибольший вклад в связывание между субъединицами фермента *E. coli*, были выделены с использованием программ SCLOCK [8] и RasMol. Так как молекула димера имеет ось симметрии 2-го порядка, достаточно рассмотреть остатки одной глобулы. Хотя большинство высоко консервативных остатков сосредоточено внутри глобулы, в области контакта субъединиц они также присутствуют. Так, на участке петли 1-30 находятся остатки Arg10, Ala12, Ala22, Leu25, Gln29, Thr30 (консервативные остатки, не взаимодействующие с другой глобулой, не указаны). Ряд аминокислот заменен на аналогичные по природе. Например, аргинины 23 и 24 в щелочных фосфатазах животного происхождения заменены на лизин. Петля 1-29 укорочена по сравнению с бактериальным ферментом, и область ее взаимодействия с комплементарным участком II должна уменьшиться.

Для контактного участка II характерна замена некоторых полярных остатков, образующих водородные связи с соседней глобулой (Thr81, Thr85, Asn428, Asp437), на неполярные группы. В области контактного участка I одним из наиболее важных для стабильности фермента из *E. coli* межглобулярных взаимодействий, по-видимому, является взаимодействие остатка Gln416 со спиралью 55-65, включающее 3 водородных связи. Оно фиксирует в нужном положении участок цепи 408-417, содержащий

группу активного центра His412. Этот контакт полностью сохраняется в ферментах животного происхождения, что подтверждает его важность для структуры белка. Основным отличием в структуре межсубъединичного контакта щелочных фосфатаз животного происхождения от бактериального изофермента является укорочение петли 1-29, что объясняет меньшую стабильность фосфатаз животного происхождения. Кроме того, в области "верхнего" домена возможно увеличение поверхности контакта за счет дополнительных вставочных последовательностей. Общая структура межбелкового контакта, а также ряд ключевых точечных взаимодействий сохраняются. Это делает допустимым использование данных по пространственной структуре фермента из *E. coli* для описания механизма инактивации щелочных фосфатаз высших организмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Полтораки О. М., Чухрай Е. С. // ЖФХ. 1995. 69. С. 330.
2. Kim E. E., Wyckoff H. W. // J. Mol. Biol. 1991. 218. P. 449.
3. Торшин И. Ю., Полтораки О. М., Чухрай Е. С. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2, Химия. 1996. 37. С. 335.
4. Kim E. E., Wyckoff H. W. // Clin. Chim. Acta. 1990. 186. P. 175.
5. Barton G. J., Sternberg M. J. E. // J. Mol. Biol. 1990. 212. P. 389.
6. Bairoch A., Arweiler R. // Nucleic Acids Res. 1996. 24. P. 21
7. Harris H. // Clin. Chim. Acta 1990. 186. P. 133.
8. Полтораки О. М., Торшин И. Ю., Чухрай Е. С. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2, Химия. 1996. 37. С. 329.
9. Barton G.J. // Protein Engineering. 1993. 6. P. 37.

Поступила в редакцию 07. 03. 97