Биомедицинская химия, 2017 том 63, вып. 6, с. 499-507.

БИОИНФОРМАТИКА

©Коллектив авторов

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СЕРИНОВЫЕ БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ ТЕМ-ТИПА: СТРУКТУРА И АНАЛИЗ МУТАЦИЙ

В.Г. Григоренко[1]*, М.Ю. Рубцова[1], И.В. Упоров[1], И.В. Иштубаев[1], И.П. Андреева[1], Д.С. Щербинин[1,2], А.В. Веселовский[3], А.М. Егоров[1]

[1]Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские Горы, д.1, стр. 3; эл. почта: vitaly.grigorenko@gmail.com
[2]Центр системной биомедицины и биотехнологий, Сколковский институт науки и технологий, Москва
[3]Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, Московская область, Черноголовка

Бета-лактамазы (КФ 3.5.2.6) представляют собой суперсемейство генетически и функционально различных бактериальных ферментов, способных гидролизовать бета-лактамные антибиотики. Наиболее распространёнными в настоящее время являются бета-лактамазы молекулярного класса А, имеющие остаток серина в активном центре. С точки зрения изучения механизмов эволюции резистентности особый интерес представляют бета-лактамазы ТЕМ-типа из-за их широкого полиморфизма. К настоящему времени описано более 200 последовательностей бета-лактамаз ТЕМ-типа, в Protein Data Bank представлены более 60 структур мутантных форм данных ферментов. Нами рассмотрены основные особенности строения ферментов данного типа, проведен анализ ключевых и вторичных мутаций, их расположения относительно активного центра и поверхности белковой глобулы. Создан информационный сайт BlaSIDB (www.blasidb.org), который является открытым информационным ресурсом, объединяющим имеющиеся данные по пространственным структурам, аминокислотным последовательностям и номенклатуре бета-лактамаз ТЕМ-типа.

Ключевые слова: бета-лактамазы ТЕМ-типа, устойчивость к антибиотикам, мутантные формы

DOI: 10.18097/PBMC20176306499

ВВЕДЕНИЕ

Проблема возникновения и развития устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, в первую очередь к бета-лактамным, является одной из наиболее актуальных в современной клинической медицине и фармакологии. Растущим угрозам, связанным с распространением мульти- и пан-резистентных бактерий, был посвящен специальный доклад ВОЗ 2014 года [1]. Известно несколько механизмов резистентности микроорганизмов к бета-лактамным антибиотикам, основным из них является ферментативный гидролиз антибиотиков ферментами бета-лактамазами. Бета-лактамазы (КФ 3.5.2.6) представляют обширную группу генетически и функционально различных ферментов, отличающихся способностью разрушать бета-лактамное кольцо, в результате чего антибиотик теряет свою антимикробную активность. Впервые данные ферменты были обнаружены в 1940 году и названы пенициллазами [2]. К настоящему времени описано более 2000 бета-лактамаз, способных гидролизовать бета-лактамные антибиотики, имеющих различную структуру и, соответственно, различающихся по субстратной специфичности, каталитической активности и устойчивости к ингибиторам [3].

По существующей в настоящее время классификации, основанной на строении активного центра, гомологии аминокислотной последовательности и наличии консервативных участков в первичной структуре ферментов, все бета-лактамазы разделяют на четыре молекулярных класса. Молекулярные классы А, С и D объединяют ферменты с остатком серина в активном центре, класс В – металлоферменты, имеющие в активном центре один или два иона цинка [4-6]. На основании различий в профиле субстратной специфичности и устойчивости к ингибиторам бета-лактамной природы (клавулановая кислота, сульбактам, тазобактам) описаны четыре фенотипа бета-лактамаз: 2b – бета-лактамазы, гидролизующие пенициллины; 2be – бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), гидролизующие пенициллины и цефалоспорины; 2br – бета-лактамазы, устойчивые к ингибиторам; 2ber – бета-лактамазы расширенного спектра, устойчивые к ингибиторам [5]. Термин БЛРС изначально использовали для обозначения мутантных форм бета-лактамаз ТЕМ и SHV типов, способных гидролизовать оксиимино-цефалоспорины, а в настоящее время он также используется для бета-лактамаз типов CTX-M, OXA, AmpC, VEB и др. [6-8].

Наиболее распространёнными сейчас являются бета-лактамазы молекулярного класса А, относящиеся к типам ТЕМ, SHV и CTX-M [1]. Все они содержат остаток серина в активном центре и имеют молекулярную массу около 29 кДа. Часть из них

Принятые сокращения: ВОЗ - Всемирная Организация Здравохранения; БЛРС - бета лактамазы расширенного спектра; ППДР - площадь поверхности, доступная растворителю; PDB - банк данных трёхмерных структур белков; BlaSIDB - информационный сайт данных о пространственной структуре, последовательностях и номенклатуре бета-лактамаз ТЕМ-типа.

* - адресат для переписки

является БЛРС, которые представляют наибольшую угрозу в клинике.

Высокая скорость распространения и разнообразие устойчивых бактерий связаны с локализацией кодирующих бета-лактамазы генов на мобильных генетических элементах и их изменчивостью [9]. Эволюция бета-лактамаз развивается по двум основным механизмам – возникновение новых мутаций у известных ферментов и появление ферментов с новой структурой. Для исследования механизмов возникновения и развития резистентности бета-лактамазы ТЕМ-типа представляют особый интерес, так как их эволюция является самой продолжительной по времени по сравнению с бета-лактамазами других типов, также они являются наиболее часто мутируемыми. В литературе отсутствует детальный анализ взаимного расположения мутаций относительно активного центра, их влияния на структуру и свойства ферментов с учётом конформационной стабильности молекулы фермента.

Целью данной работы было проведение анализа последовательностей и структур бета-лактамаз ТЕМ-типа, а также выявление поверхностных остатков, способствующих стабилизации/дестабилизации ферментов, методом компьютерного моделирования. Подобный анализ расположения мутаций и их взаимного влияния на каталитическую активность бета-лактамаз важен для понимания взаимосвязей структура-активность данного семейства ферментов, а также для поиска новых поверхностных мишеней для эффективного ингибирования бета-лактамаз.

1. СТРУКТУРА И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ БЕТА-ЛАКТАМАЗ ТЕМ-ТИПА

Бета-лактамазы ТЕМ-типа являются пенициллиназами и цефалоспориназами и относятся к часто продуцируемым бета-лактамазам бактериями, вызывающими внутригоспитальные инфекции [10, 11]. Первым охарактеризованным ферментом этой группы была пенициллаза ТЕМ-1, обнаруженная в 1965 г. в клетках *Escherichia coli*, выделенных из крови инфицированного пациента [12]. Позднее плазмиды с геном бета-лактамазы ТЕМ-1 были найдены в штаммах других представителей грамотрицательных бактерий. Через несколько лет был выделен фермент ТЕМ-2, отличавшийся одной аминокислотной мутацией Gln39Lys с таким же профилем субстратной специфичности [13]. Следующий фермент ТЕМ-3 характеризовался сочетанием двух мутаций: ранее обнаруженной Gln39Lys и новой заменой Glu104Lys. Этот фермент был способен гидролизовать и пенициллины и цефалоспорины и поэтому имел расширенный спектр субстратной специфичности [13]. Позже плазмиды с геном данного фермента были найдены в штаммах других представителей семейства *Enterobacteriaceae,* в штаммах *Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae* и др.

Бета-лактамазы ТЕМ-типа характеризуются значительным разнообразием мутантных форм. Описано уже более 200 представителей ферментов данного типа (http://www.lahey.org/studies). Эволюция данных ферментов и основные свойства рассмотрены в обзорах [14, 15].

Бета-лактамазы ТЕМ-типа имеют компактную структуру, образованную одной полипептидной цепью. Третичная структура белка состоит из трёх доменов, образованных как сэндвич-комплекс из α-спиралей, β-листа и α-спиралей [16]. Активный центр расположен между β-листом и α_2-спиралью. Белок является высокоорганизованным и стабильным, изменчивость наблюдается только в петлях [17].

Первичная последовательность фермента ТЕМ-1 включает 288 аминокислотных остатков. Все ферменты данного типа являются мутантными формами исходного фермента ТЕМ-1 и содержат от одной до семи точечных мутаций. Необходимо отметить, что ферменты ТЕМ-типа мутируют чаще бета-лактамаз других типов. Описаны мутации для 92 аминокислотных остатков, что составляет 32% первичной последовательности. Частота мутаций в каждом положении сильно варьирует. Мы провели анализ частоты встречаемости различных мутаций (рис. 1). Наиболее часто встречаются мутации в положениях 21, 39, 69, 104, 164, 182, 238, 240, 244, 265 и 275.

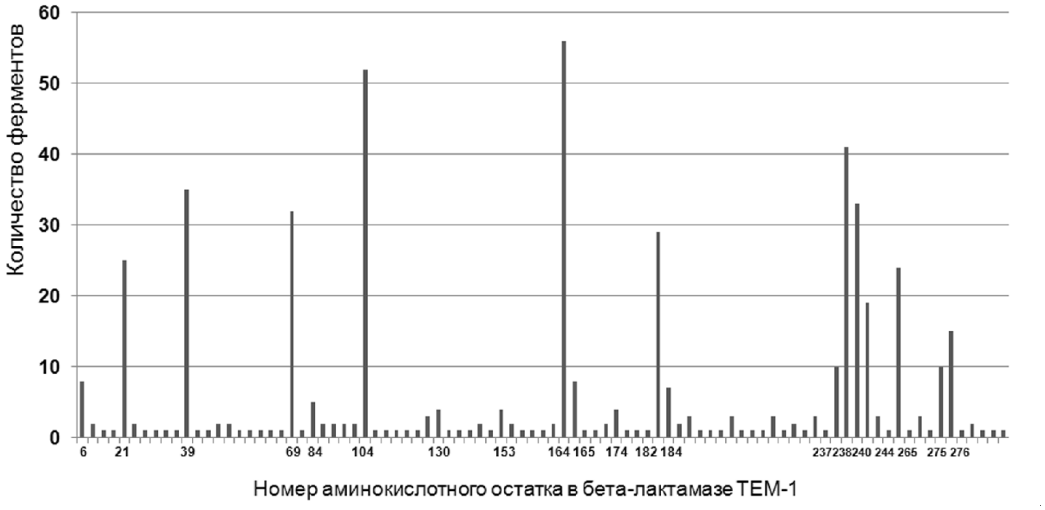


Рисунок 1. Анализ частоты встречаемости различных мутаций в бета-лактамазах ТЕМ-типа.

В таблице 1 приведены данные по частоте встречаемости наиболее распространенных мутаций у бета-лактамаз TEM-типа и их предполагаемой функциональной роли на основании анализа работы [18]. Ключевыми для расширения профиля субстратной специфичности (фенотип 2be) являются мутации в положениях 104, 164, 238 и 240. Мутация Gly238Ser приводит к появлению ферментов, способных одинаково хорошо разрушать цефотаксим и цефтазидим, в то время как ферменты, содержащие мутацию Arg164Ser, более активны с цефтазидимом и менее – с цефотаксимом. Существуют мутации в положениях 69, 244, 275 и 276, приводящие к появлению ферментов, нечувствительных к действию ингибиторов бета-лактамной природы (клавулановая кислота и др.) (фенотип 2br).

Ключевые мутации составляют не более 10% от всех выявленных мутаций в бета-лактамазах TEM-типа. Мутирующие ключевые остатки расположены близко к активному центру фермента и могут приводить к небольшим структурным изменениям, влияющим на каталитическую активность фермента [16, 21]. Как правило, они приводят к существенным изменениям конфигурации петель [19].

Помимо функциональных (ключевых) мутаций, последовательности бета-лактамаз содержат мутации остатков аминокислот, расположенных вдали от каталитического центра фермента, механизм влияния которых не установлен, и поэтому в литературе они получили название вторичных или сопутствующих. Была выдвинута гипотеза, что эти мутации, расположенные вдали от активного центра фермента, способны компенсировать дефекты в стабильности, вызванные ключевыми мутациями [15, 20]. Статистические данные по частоте встречаемости мутаций у бета-лактамаз разных фенотипов приведены в таблице 2. Остаток 130, по-видимому, также является ключевым, так как он встречается только у бета-лактамаз с изменённым фенотипом. Кроме ключевых мутаций, наиболее часто у бета-лактамаз TEM-типа встречаются мутации в положениях 39, 182, 265. Остатки 39, 165, 265, 182 представляют большой интерес для изучения, так как встречаются у всех фенотипов бета-лактамаз, связанных с расширением субстратной специфичности и устойчивости к ингибиторам. В литературе была предпринята попытка оценить взаимное влияние мутаций по результатам изменения чувствительности штаммов к цефотаксиму (цефалоспорину III поколения), однако сделанные выводы были неоднозначны вследствие трудностей интерпретации структурных изменений только на основе результатов фенотипических тестов [18]. Поэтому далее был проведён анализ расположения часто мутирующих остатков на пространственной модели ферментов.

2. АНАЛИЗ СТРУКТУР БЕТА-ЛАКТАМАЗ TEM-ТИПА

Пространственная структура некоторых бета-лактамаз TEM-типа изучена методом рентгеноструктурного анализа. В базе данных PDB содержится более 60 структур как самой бета-лактамазы TEM-1, так и её природных мутантов. Наличие такой информации позволяет анализировать расположение мутируемых остатков относительно активного центра белка и сформулировать гипотезы о влиянии мутаций на стабильность и каталитические свойства фермента.

Расположение аминокислот, подверженных функциональным и сопутствующим мутациям, в структуре фермента представлено на рисунке 2. Ключевые (функциональные) мутации затрагивают аминокислотные остатки, расположенные в непосредственной близости от активного центра фермента (окрашены синим и оранжевым цветами). Так, мутации Gly238Ala (PDBID 1JWV), Glu104Lys и Arg164Ser (PDBID 1JWZ) вызывают

Таблица 1. Установленное и предполагаемое значение мутаций некоторых аминокислотных остатков в последовательности бета-лактамаз TEM-типа (по данным [18]). Приведены только остатки, мутации которых встречаются в природе. Жирным шрифтом выделены ключевые мутации, способствующие расширению субстратной специфичности

Номер остатка	Количество TEM бета-лактамаз, имеющих замену данного остатка	Предполагаемая функция
104	48	Взаимодействие с карбоксильной группой субстрата
164	48	Связан с Ω-петлей, у мутанта наблюдается большая доступность активного центра
238	38	Мутация приводит к расширению активного центра при изменении положения β-листа или Ω-петли
240	31	Отвечает за взаимодействие с субстратом, возможно, играет стабилизирующую роль
182	27	Повышает термодинамическую стабильность, может снижать вероятность неправильного фолдинга и агрегации
265	20	Механизм неизвестен, возможна стабилизирующая роль
237	9	Образует дополнительную водородную связь с карбонильной группой бета-лактамного кольца
254	3	Механизм неизвестен, возможна стабилизирующая роль
268	2	Механизм неизвестен, возможна стабилизирующая роль

Таблица 2. Анализ распространённости сопутствующих мутаций в бета-лактамазах ТЕМ-типа, имеющих различный фенотип

Номер остатка	Количество ТЕМ бета-лактамаз, имеющих замену данного остатка	Количество бета-лактамаз с разными фенотипами				
		2b	2be	2br	2ber	Фенотип не определен
39	34	2	25	5	2	-
84	5	1	1	-	-	3
130	4	-	1	2	1	-
153	4	-	3	-	-	1
165	8	-	1	5	1	1
182	29	1	22	2	-	4
184	7	1	3	-	-	3
213	3	-	-	--	-	3
224	3	-	2	-	-	1
237	10	-	9	-	1	-
265	24	2	17	2	1	2
268	3	-	2	-	-	1
51	1	-	1	-	-	-
120	1	-	-	-	-	1
173	1	-	1	-	-	-

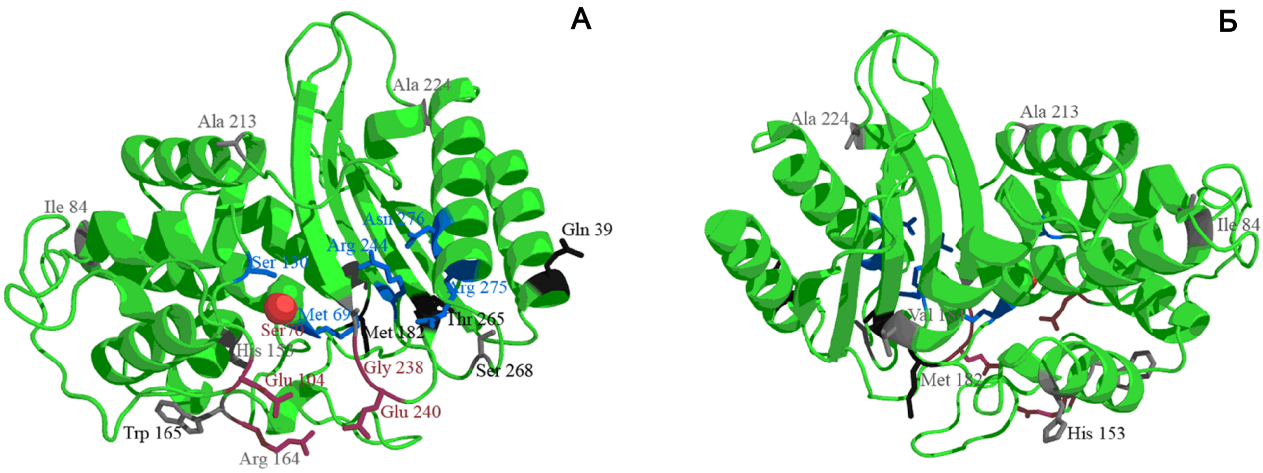


Рисунок 2. А) Схематический вид третичной структуры бета-лактамазы ТЕМ-1 (PDBID 1BTL) Остаток каталитического серина Ser70 расположен в центре рисунка (атом O_γ боковой цепи показан в виде красного шарика). Оранжевым цветом изображены боковые цепи остатков, мутации которых приводят к появлению расширенного спектра действия (ESBL) фермента (Glu104, Arg164, Glu240, Gly238). Синим цветом изображены боковые цепи остатков, мутации которых приводят к появлению ингибиторной резистентности (IR) фермента (Met69, Ser130, Arg244, Arg275, Asn276). Остатки, мутации которых являются сопутствующими, показаны чёрным цветом (часто мутируемые Gln39, Thr265, Met182) и серым (редко мутируемые Ile84, His153, Trp165, Val184, Ala213, Ala224, Ala237, Ser268). Б). Структура бета-лактамазы ТЕМ-1 повёрнута на 180 градусов вокруг вертикальной оси, лежащей в плоскости рисунка.

конформационные изменения, увеличивающие область связывания субстрата (цефалоспоринов II и III поколения), что приводит к появлению у мутантов фенотипа БЛРС (2be) [20].

Мутации, приводящие к появлению фенотипа устойчивости к ингибиторам (2br), изучены для бета-лактамаз ТЕМ-типа не столь исчерпывающе, как мутации, приводящие к фенотипу БЛРС. В работе [21] описана структура искусственного мутанта бета-лактамазы, содержащего мутацию Arg275Leu (PDBID 3DTM). Авторы показали, что эта мутация приводит к повышению термостабильности мутанта по сравнению с бета-лактамазой ТЕМ-1 за счёт более плотной упаковки белковой матрицы и отсутствия гуанидиновой группы, не полностью экспонированной в растворитель.

Изучение мутаций остатка Met69, также приводящих к появлению фенотипа устойчивости к ингибиторам, методами мутагенеза, РСА и молекулярной динамики показало, что они вызывали только незначительные изменения положения окружающих атомов по сравнению с бета-лактамазой ТЕМ-1 [22]. При этом замена Met69Leu приводила к повышению константы диссоциации комплекса фермент-ингибитор (клавулановая кислота, сульбактам, тазобактам) в десятки раз на стадии, предшествующей

ацилированию, то есть способствовала ухудшению связывания ингибитора с мутантной формой бета-лактамазы по сравнению с ферментом TEM-1.

Расположение часто мутирующих остатков по отношению к активному серину 70 и поверхности белковой глобулы представлено на рисунке 3. Как видно из рисунков 2 и 3 сопутствующие мутации (серые и чёрные остатки на рис. 2) находятся вдали от активного центра фермента (за исключением остатка 69). Расстояние между C_α атомами мутируемых остатков и соответствующим углеродом каталитического остатка Ser70 составляет от 10 и более Å (за исключением Ala237), что делает невозможным прямое влияние мутаций рассматриваемых сопутствующих остатков на каталитические свойства ферментов.

О расположении остатков относительно поверхности белка можно судить по степени экспонированности исследуемого аминокислотного остатка в растворитель, которая пропорциональна величине площади поверхности, доступной растворителю (ППДР). В таблице 3 представлены результаты расчётов ППДР и оценки влияния мутаций остатков на стабильность фермента.

Большинство из остатков, мутации которых относятся к сопутствующим, экспонируют гидрофобные боковые цепи в растворитель. Мутации таких остатков на полярные или заряженные будут способствовать повышению гидрофильности белковой глобулы и увеличению её термостабильности.

Из остатков, подверженных сопутствующим мутациям, остаток Ala237 находится ближе всего к каталитическому остатку серина. По этому критерию его мутации в дальнейшем могут быть отнесены к функциональным, если для них будет установлено изменение каталитических свойств фермента. В большинстве случаев (в 9 из 10) происходят его замены на треонин. Влияние такой мутации на стабильность фермента трудно однозначно предсказать, поскольку она будет в значительной степени определяться конформацией боковой группы треонина. Если его гидроксильная группа будет направлена в сторону центра связывания фермента, то замена остатка будет влиять на эффективность связывания субстрата/ингибитора с белком. Если же гидроксильная группа будет направлена в сторону растворителя, то вероятна её гидратация и взаимодействие с расположенным вблизи Arg244. В последнем случае в центр связывания будет направлена метильная группа боковой цепи треонина, что повлияет на эффективность связывания субстрата/ингибитора.

Остаток Trp165 входит в состав так называемой омега-петли, формирующей область связывания субстрата ферментом, и является единственным из четырёх остатков триптофана, подверженных мутациям. Индольное кольцо этого остатка полностью экспонировано в растворитель. У бета-лактамаз TEM-типа наблюдаются замены 165 остатка на несколько аминокислот (Arg, Cys, Gly, Leu) [18]. Недавно были разрешены структуры трёх мутантов бета-лактамаз, каждая из которых содержала тройные мутации в омега-петле Trp165Tyr/Glu166Tyr/Pro167Gly [23]. Результатом такой тройной мутации стала кардинальная перестройка конформации омега-петли, которая привела к значительному увеличению размеров области связывания субстрата. Кроме того, тройная мутация способствовала увеличению

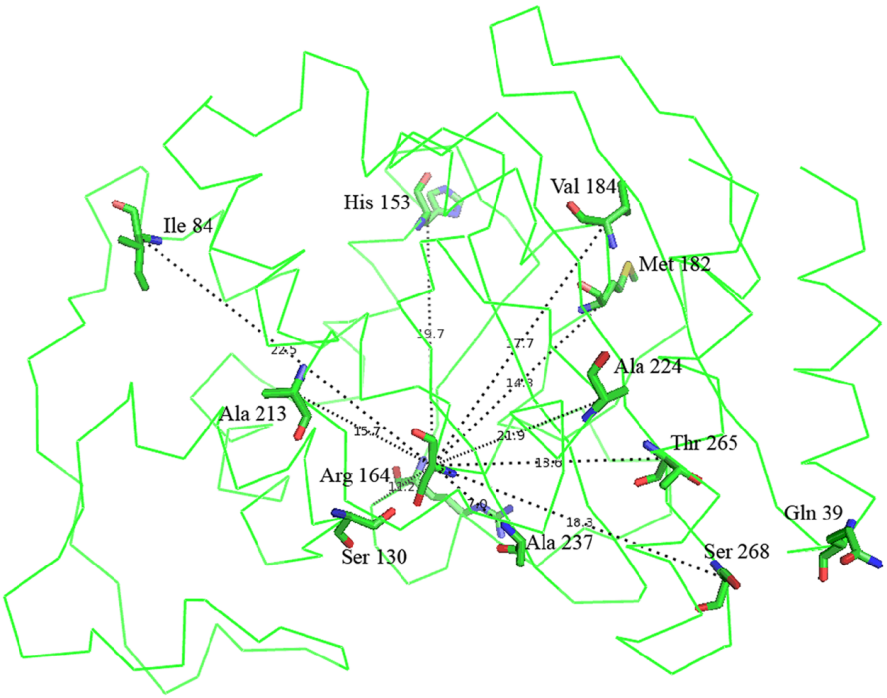


Рисунок 3. Расположение сопутствующих мутаций относительно каталитического серина Ser70 в бета-лактамазе TEM-1. Белок показан в trace представлении (C_α атомы). C_α атомы мутируемых остатков соединены пунктирными линиями с Ser70 C_α.

Таблица 3. Анализ расположения отдельных остатков в белковой глобуле бета-лактамаз ТЕМ-типа

Номер остатка	Количество ТЕМ бета-лактамаз, содержащих мутацию	Расстояние между Ser70 C_α и C_α атомом остатка, Å	ППДР боковой группы остатка, Å^2/ общая ППДР остатка, Å^2	Экспонированность в растворитель/ возможность влияния на стабильность глобулы
237	10	7,0	15,2 (29,1)	+ Влияние определяется конформацией боковой группы треонина
165	8	11,2	71,6 (71,9)	+ Влияние возможно
51	1	22,5	12,5 (14,0)	+ Увеличение стабильности
84	5	22,5	16,7 (27,9)	+ Увеличение стабильности
130	4	6,7	8,1 (8,3)	- Неизвестно
153	4	19,7	75,2 (78,5)	+ Увеличение стабильности
173	1	22,6	34,0 (40,0)	+ Увеличение стабильности
182	29	14,8	29,7 (29,7)	+ Увеличение стабильности
224	3	21,9	3,0 (19,5)	- Увеличение стабильности
265	24	13,6	0,7 (1,8)	- Увеличение стабильности
268	3	18,3	0,4 (6,4)	- Увеличение стабильности
39	34	24,3	58,9 (91,3)	+ Выявлена сеть водородных связей, нарушение которой может уменьшить стабильность
120	1	18,1	85,3 (85,3)	+ Понижение стабильности
184	7	17,7	10,6 (12,4)	+ Понижение стабильности
213	3	15,7	22,0 (28,5)	+ Понижение стабильности

тепловой подвижности петли. При этом ход полипептидной цепи в районе 165 остатка остался без существенных изменений. На основании этих данных невозможно сделать заключение, приводит ли мутация Trp165 к существенному изменению конформации и подвижности омега-петли. Если предположить обратное, то замена индольного кольца триптофана на боковые цепи других аминокислот будет влиять на структуру белка в зависимости от гидрофобности или гидрофильности заменяющего остатка.

Эффект сопутствующих мутаций может заключаться как в стабилизации, так и дестабилизации белковой глобулы. Анализ степени экспонированности в растворитель и типов наблюдаемых замен показал, что к остаткам, потенциально способствующим при заменах увеличению стабильности фермента, относятся 51, 84, 153, 173, 182, 224, 265, 268.

Остаток Leu51 формирует бета-изгиб, соединяющий два бета-тяжа. Мутация этого остатка на Pro привела бы к канонической аминокислотной последовательности бета-изгиба и понизила бы энергию конформационных напряжений при формировании этого элемента третичной структуры, что будет способствовать повышению стабильности белка.

Остаток Val84 у некоторых бета-лактамаз заменяется на Ile. Сравнивая пространственные структуры ферментов, содержащих в этом положении как Val (PDB 1XPB), так и Ile (PDB 1BTL), можно заметить, что при мутации удлинение гидрофобной боковой цепи происходит в глубину белковой глобулы (рис. 4). Такая конформация боковой группы этого остатка не увеличивает энергию гидрофобного взаимодействия с водой (величина ППДР остатка 84 не изменяется), но уплотняет гидрофобное ядро белковой глобулы, что повышает стабильность фермента.

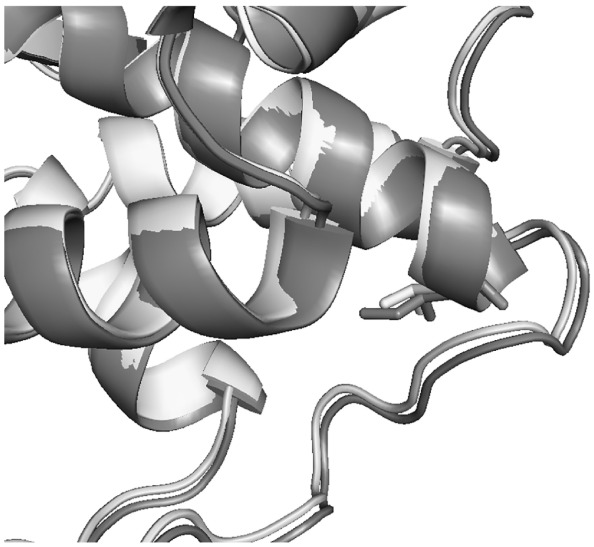


Рисунок 4. Взаимное расположение остатков Val84 (светло-серый, PDB 1XPB) и Ile84 (тёмно-серый, PDB 1BTL) в бета-лактамазах ТЕМ-типа.

Боковая группа His153 экспонирована в растворитель и его имидазольное кольцо параллельно кольцу His158 (расстояние между C_γ атомами остатков составляет 4,6 Å). Возможно, что такая взаимная конформация остатков стабилизирована стэкинг-взаимодействием между ними. Благодаря такому взаимному расположению колец, сольватации подвергается сдвоенная пара колец (молекулы воды между ними не помещаются). При мутации 153 остатка на Arg эта структура разрушается. В результате боковые цепи остатков 153 и 158 сольватируются по отдельности, что приводит к более низкой энергии сольватации, то есть повышению стабильности белка. Вблизи протонированной боковой группы Arg153 находится карбонильный кислород основной цепи His158, который может служить акцептором водородной связи с Arg153. Установление такой связи также будет способствовать повышению термостабильности молекулы.

При замене Ile173Val экспонированная гидрофобная боковая группа остатка Ile заменяется на более короткую боковую группу Val, при этом уменьшается энергия гидратации всей белковой глобулы, что может способствовать повышению стабильности белка.

Мутация остатка Ala224 на гидрофобную аминокислоту (для трёх вариантов бета-лактамаз наблюдается остаток валина в этом позиции) может привести к более плотной упаковке гидрофобного ядра белковой глобулы, что будет способствовать её стабилизации.

Остаток Thr265 в бета-лактамазах TEM-типа заменяется на метионин. Гидроксильная группа треонина образует водородную связь с кислородом пептидной группы Arg43 (расстояние между соответствующими атомами кислорода составляет 2,8 Å). При возникновении мутации Thr265Met водородная связь исчезает, расстояние между C_α атомами Ser70 и Met265 составляет 13,6 Å. Боковая цепь Met265 направлена в сторону, противоположную активному центру, и отделена от него бета-листом. Более длинная боковая цепь метионина заполняет прилегающую гидрофобную область внутри белковой глобулы. Выигрыш в гидрофобном взаимодействии за счёт более плотной упаковки алифатических групп может компенсировать проигрыш в свободной энергии белка от исчезновения водородной связи и привести к повышению термостабильности фермента.

Остаток Ser268 у ряда бета-лактамаз меняется на глицин [18]. Эта мутация повышает стабильность фермента, поскольку из гидрофобного ядра убирается полярная боковая цепь серина.

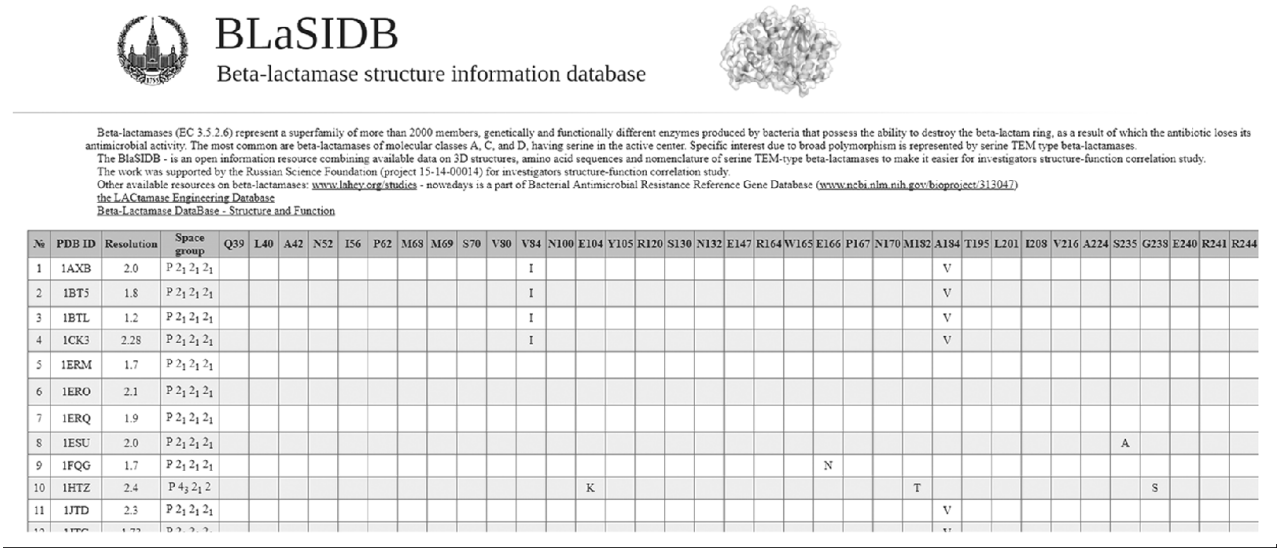
Интерес с точки зрения подавления резистентности ингибированием бета-лактамаз представляют остатки, мутации которых способствуют понижению стабильности белковой глобулы. Такими могут быть остатки 39, 120, 184 и 213. Особый интерес представляет остаток 39, расположенный на поверхности белковой глобулы удалённо от области активного центра. Он относится к наиболее часто мутируемым, причём мутации встречаются у бета-лактамаз с разными фенотипами. Ранее нами было экспериментально установлено уменьшение термостабильности бета-лактамаз TEM-типа, имеющих замену Gln39Lys в сочетании с ключевыми мутациями [24]. Возможным объяснением этого факта является выявленная методом моделирования сеть водородных связей от остатков Gln 39 и Lys 32, относящихся к N-концевой α-спирали, до остатков Arg244 и Gly236, расположенных вблизи активного центра фермента.

Таким образом, анализ известных пространственных структур бета-лактамаз TEM-типа показывает, что сопутствующие мутации, хотя и не приводят к существенным перестройкам в структуре фермента, но могут влиять на локальные участки в области мутации. В зависимости от расположения мутаций, типа аминокислотной замены и сочетания с другими мутациями механизмы их влияния на каталитические свойства и стабильность бета-лактамаз могут быть различны. Для удобства дальнейшего исследования влияния единичных мутаций и их сочетаний в бета-лактамазах TEM-типа нами был создан соответствующий информационный ресурс.

3. СОЗДАНИЕ ИНФОРМАЦИОННОГО РЕСУРСА ПО БЕТА-ЛАКТАМАЗАМ TEM-ТИПА

Из существующих в настоящее время информационных ресурсов, посвященных суперсемейству бета-лактамаз, стоит отметить базу данных (http://www.lahey.org/Studies/), созданную в 2001 году под руководством George Jacoby и Karen Bush для стандартизации номенклатуры растущего числа бета-лактамаз, включающую ферментные группы TEM, SHV, OXA, CTX-M, CMY, AmpC, CARB, IMP, VIM, KPC, GES, PER, VEB и другие типы. С июля 2015 года эта база данных стала составной частью проекта Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/313047/). На сайте института Пастера (http://bigsdb.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html) поддерживается база данных по номенклатуре для бета-лактамаз LEN, OXY и OKP типа. База данных LacED (http://www.laced.uni-stuttgart.de) содержит информацию, собранную на основе NCBI и PDB, по всем имеющимся последовательностям бета-лактамаз TEM и SHV типов, включая гомологичные структуры и фрагменты [25].

Амбициозный проект по обобщению всех имеющихся данных по всем классам бета-лактамаз, который включает биохимические и структурные данные, представлен на сайте (http://bldb.eu/). BLDB содержит информацию по более чем 2600 уникальным ферментам, а также более 800 пространственных структур, относящимся к четырём молекулярным классам бета-лактамаз [26]. Однако такой подход имеет определённые недостатки, связанные со сложным и многоуровневым интерфейсом баз данных, а также некоторыми неточностями в номенклатуре и структурах бета-лактамаз. Так, в базе данных BLDB все пространственные структуры бета-лактамаз



BLaSIDB

Beta-lactamase structure information database

Beta-lactamases (EC 3.5.2.6) represent a superfamily of more than 2000 members, genetically and functionally different enzymes produced by bacteria that possess the ability to destroy the beta-lactam ring, as a result of which the antibiotic loses its antimicrobial activity. The most common are beta-lactamases of molecular classes A, C, and D, having serine in the active center. Specific interest due to broad polymorphism is represented by serine TEM type beta-lactamases.
The BlaSIDB - is an open information resource combining available data on 3D structures, amino acid sequences and nomenclature of serine TEM-type beta-lactamases to make it easier for investigators structure-function correlation study.
The work was supported by the Russian Science Foundation (project 15-14-00014) for investigators structure-function correlation study
Other available resources on beta-lactamases: www.lahey.org/studies - nowadays is a part of Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database (www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/313047)
the LACtamase Engineering Database
Beta-Lactamase DataBase - Structure and Function

№	PDB ID	Resolution	Space group	Q39	L40	A42	N52	I56	P62	M68	M69	S70	V80	V84	N100	E104	Y105	R120	S130	N132	E147	R164	W165	E166	P167	N170	M182	A184	T195	L201	I208	V216	A224	S235	G238	E240	R241	R244
1	1AXB	2.0	$P\,2_1\,2_1\,2_1$											I														V										
2	1BT5	1.8	$P\,2_1\,2_1\,2_1$											I														V										
3	1BTL	1.2	$P\,2_1\,2_1\,2_1$											I														V										
4	1CK3	2.28	$P\,2_1\,2_1\,2_1$											I														V										
5	1ERM	1.7	$P\,2_1\,2_1\,2_1$																																			
6	1ERO	2.1	$P\,2_1\,2_1\,2_1$																																			
7	1ERQ	1.9	$P\,2_1\,2_1\,2_1$																																			
8	1ESU	2.0	$P\,2_1\,2_1\,2_1$																															A				
9	1FQG	1.7	$P\,2_1\,2_1\,2_1$																					N														
10	1HTZ	2.4	$P\,4_3\,2_1\,2$													K											T								S			
11	1JTD	2.3	$P\,2_1\,2_1\,2_1$																									V										

Рисунок 5. Веб-интерфейс BlaSIDB для анализа структурных данных бета-лактамаз ТЕМ-типа.

ТЕМ-типа (http://bldb.eu/S-BLDB.php) аннотированы как ТЕМ-1, тогда как многие из них содержат мутации и не соответствуют принятой номенклатуре (http://www.lahey.org/Studies/temtable.asp). Например, структура (PDBID 1BTL), обозначенная как ТЕМ-1, на самом деле имеет две замены по сравнению с ферментом дикого типа (Val84Ile и Ala184Val).

Нами создан открытый информационный ресурс BlaSIDB (Beta-lactamase Structure Information Data Base) для комплексного анализа существующих структурных данных бета-лактамаз ТЕМ-типа на основе нуклеотидных и белковых последовательностей бета-лактамаз в международных банках данных, включая Genbank и специализированную базу бета-лактамаз (http://www.lahey.org/studies/temtable.asp). Ресурс располагается на виртуальном сервере (http://www.blasidb.org/) и содержит интерактивную таблицу, где представлены идентификаторы известных в настоящее время пространственных структур бета-лактамаз ТЕМ-типа с указанным разрешением и типом пространственной группы кристаллической ячейки и лигандами (рис. 5). Для каждой структуры представлены данные по первичной последовательности с указанием номеров аминокислотных остатков в канонической нумерации (по Ambler) и мутаций по сравнению с ферментом дикого типа ТЕМ-1. Также приведена номенклатура соответствующих форм бета-лактамаз, где это применимо. Интерактивный интерфейс позволяет проводить сортировку элементов по каждой из позиций (номер, разрешение, мутируемый аминокислотный остаток и т.д.). Обновление структур происходит вручную еженедельно, после каждого обновления PDB. Существующая форма обратной связи представляет возможность всем заинтересованным специалистам участвовать в развитии настоящей базы данных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (Проект № 15-14-00014).

ЛИТЕРАТУРА

1. Antimicrobial Resistance Global Report on surveillance 2014 World Health Organization http://www.who.int/drugresistance/en/
2. *Abraham E.P., Chain E.* (1940) Nature, **46**, 837-837.
3. *Bonomo R.A.* (2017) Cold Spring Harb. Perspect. Med., **7**, 1-15.
4. *Ambler R.P., Coulson A.F., Frère J.M., Ghuysen J.M., Joris B., Forsman M., Levesque R.C., Tiraby G., Waley S.G.* (1991) Biochem. J., **276**, 269-270.
5. *Bush K., Jacoby G.A.* (2010) Antimicrob. Agents Chemother., **54**, 969-976.
6. *Bush K.* (2013) Ann. N.-Y. Acad. Sci., **1277**, 84-90.
7. *Livermore D.M.* (2008) Clin. Microbiol. Infect., **14**, Suppl.1, 3-10.
8. *Lee J.H., Bae I.K., Lee S.H.* (2012) Medicinal Res. Rev., **32**, 216-232.
9. *Baquero F., Tedim A.P., Coque T.M.* (2013) Front Microbiol., **4**, 1-15.
10. *Medeiros A.A.* (1997) Clin. Infect. Dis., **24**, S19–S45.
11. *Matagne A., Lamotte-Brasseur J., Frere J.M.* (1998) Biochem. J., **330**, 581-598.
12. *Datta N., Kontomichalou P.* (1965) Nature, **208**, 239-241.
13. *Du Bois S.K., Marriott M.S., Amyes S.G.* (1995) J. Antimicrob. Chemother., **35**, 7-22.
14. *Pimenta A.C., Fernandes R., Moreira I.S.* (2014) Mini Rew. Med. Chem., **14**, 111-122.
15. *Salverda M.L., De Visser J.A., Barlow M.* (2010) FEMS Microbiol. Rev., **34**, 1015-1036.
16. *Stec B., Holtz K.M., Wojciechowski C.L., Kantrowitz E.R.* (2005) Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., **61**, 1072-1079.
17. *Fisette O., Morin S., Savard P.Y., Lagüe P., Gagné S.M.* (2010) Biophys. J., **98**, 637-645.
18. *Guthrie V.B., Allen J., Camps M., Karchin R.* (2011) PLoS Computational Biology, **7**, e1002184, 1-20.
19. *Dellus-Gur E., Toth-Petroczy A., Tawfik D.S.* (2013) J. Mol. Biol., **425**, 2609-2621.
20. *Wang X., Minasov G., Shoichet B.K.* (2002) J. Mol. Biol., **320**, 85-95.
21. *Kather I., Jakob R.P., Dobbek H., Schmid F.X.* (2008) J. Mol. Biol., **383**, 238-251.
22. *Meroueh S.O., Roblin P., Golemi D., Maveyraud L., Vakulenko S.B., Zhang Y., Samama J.P., Mobashery S.* (2002) J. Am. Chem. Soc., **124**, 9422-9430.

23. *Stojanoski V., Chow D.C., Hu L., Sankaran B., Gilbert H.F., Prasad B.V., Palzkill T.* (2015) J. Biol. Chem., **290**, 10382-10394.
24. *Grigorenko V., Uporov I., Rubtsova M., Andreeva I., Shcherbinin D., Veselovsky A., Serova O., Ulyashova M., Ishtubaev I., Egorov A.* (2017) FEBS Open Bio, DOI: 10.1002/2211-5463.12352.
25. *Thai Q.K., Bös F., Pleiss J.* (2009) BMC Genomics, **10**, 390.
26. *Naas T., Oueslati S., Bonnin R.A., Dabos M.L., Zavala A., Dortet L., Retailleau P., Iorga B.I.* (2017) J. Enz. Inh. Med. Chem., **32**, 917-919.

Поступила: 30. 10. 2017.
Принята к печати: 16. 11. 2017.

BACTERIAL TEM-TYPE SERINE BETA-LACTAMASES: STRUCTURE AND ANALYSIS OF MUTATIONS

V.G. Grigorenko[1], M.Yu. Rubtsova[1], I.V. Uporov[1], I.V. Ishtubaev[1], I.P. Andreeva[1], D.S. Shcherbinin[1,2], A.V. Veselovsky[3], A.M. Egorov[1]

[1]Chemical Department of M.V. Lomonosov Moscow State University,
1, bld. 3 Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia; e-mail: vitaly.grigorenko@gmail.com
[2]Center for Data-Intensive Biomedicine and Biotechnology,
Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia
[3]Institute of Physiologically Active Compounds, Moscow region, Chernogolovka, Russia

Beta-lactamases (EC 3.5.2.6) represent a superfamily containing more than 2,000 members: it includes genetically and functionally different bacterial enzymes capable to destroy the beta-lactam antibiotics. The most common are beta-lactamases of molecular class A with serine in the active center. Among them, TEM-type beta-lactamases are of particular interest from the viewpoint of studying the mechanisms of the evolution of resistance due to their broad polymorphism. To date, more than 200 sequences of TEM-type beta-lactamases have been described and more than 60 structures of different mutant forms have been presented in Protein Data Bank. We have considered the main structural features of the enzymes of this type with particular attention to the analysis of key drug resistance and the secondary mutations, their location relative to the active center and the surface of the protein globule. We have developed the BlaSIDB database (www.blasidb.org) which is an open information resource combining available data on 3D structures, amino acid sequences and nomenclature of the corresponding forms of beta-lactamases.

Key words: database, TEM-type beta-lactamases, antibiotic resistance, mutants