

УДК 577.32

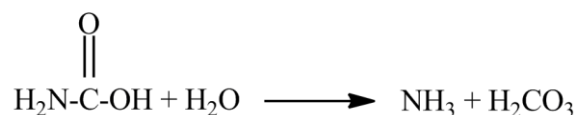
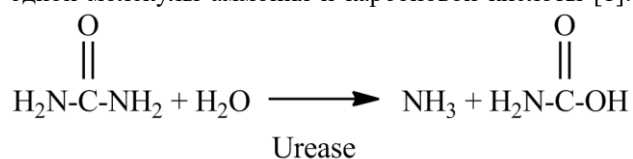
## СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ УРЕАЗ

Лисняк Ю. В., Мартынов А. В.

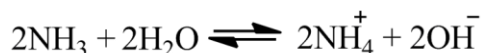
ГУ “Институт микробиологии и иммунологии им.  
И.И. Мечникова Национальной академии  
медицинских наук Украины”

### Введение

Уреаза – это никельсодержащий металлофермент (амидогидролаза мочевины, ЕС 3.5.1.5), который катализирует гидролиз мочевины с образованием аммония и карбамата. В водной среде карбамат спонтанно и быстро разлагается с образованием еще одной молекулы аммония и карбоновой кислоты [1]:



Карбоновая кислота и две молекулы аммиака в растворе находятся в равновесии с их депротонированной и протонированной формами:



Эффектом этих реакций является возрастание pH. Уреаза продуцируется различными бактериями [1-11], дрожжами [2, 12, 13], растениями [1, 2, 12, 14, 15] и некоторыми беспозвоночными [11, 14, 15]. В организме человека и животных уреазы образуются бактериальной флорой [16-18]. Уреаза является вирулентным фактором многих патогенных бактерий, в частности, таких, как *Helicobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* и *Mycobacterium* spp. [1, 2, 19-21]. Уреаза существенна в колонизации организма-хозяина и в поддержании жизнедеятельности бактериальных клеток в тканях. Увеличение количества аммиака и последующее повышение pH в окружающей среде, обусловленное ферментативной активностью уреаз, вызывает негативные последствия как для здоровья человека и животных, так и для роста и развития растений [1, 2]. Уреазы также обладают рядом биологических свойств, не связанных с их ферментативной активностью [21-24]. Растительные и бактериальные уреазы являются токсичными по отношению к нитчатому грибу и дрожжам. Растительные и некоторые бактериальные уреазы обладают мощным инсектицидным действием. В моделях

млекопитающих некоторые уреазы являются нейротоксичными независимо, по крайней мере – частично, от их ферментативного действия. Уреазы активируют экзоцитоз в различных клетках млекопитающих даже если их уреолитическая активность заблокирована необратимым ингибитором. Уреазы являются факторами хемотаксиса, которые узнаются нейтрофилами (и некоторыми бактериями), активируя их (а также и тромбоциты) в пред-инфекционный “статус” [21-24]. Такая разносторонняя активность уреаз стимулировала широкий интерес к исследованию их свойств и, в частности, структуры и пространственной организации уреаз, как основы их функциональных особенностей. В данном обзоре кратко рассматриваются основные принципы структурной организации бактериальных уреаз. Наряду с данными ранних структурных исследований уреаз, ставшими уже классикой, обзор охватывает результаты исследований трехмерной структуры этих ферментов последних лет.

### Уреаза и мочевина - важные исторические вехи в ранних структурных исследованиях

Уреаза и ее субстрат, мочевина, явились важными историческими вехами в ранних структурных химических исследованиях. Мочевина была первой синтезированной органической молекулой [25, 26]. Уреаза из экстрактов канавалии мечевидной (*Canavalia ensiformis*, или уреазы конских бобов, Jack Bean Urease, JBU) была первым ферментом, который был получен в кристаллической фазе. Это удалось сделать Джеймсу Самнеру в 1926 году [27], за что он был удостоен Нобелевской премии по химии в 1946 году. Важность работы Дж. Самнера состояла в том, что, во-первых, она показала, что ферменты имеют белковую природу (что в то время было далеко не очевидным фактом [28]), и, во-вторых, впервые продемонстрировала возможность получения белков в кристаллическом виде, что стимулировало появление и развитие одного из самых мощных методов анализа белковых структур – кристаллографии белков [29]. В 1975 году уреазы конских бобов JBU была также идентифицирована как первый представитель никельсодержащих металлоферментов [30, 31], число которых, помимо уреазы, в настоящее время достигло восьми [32, 33]. Молекулярную структуру уреазы JBU удалось определить методом рентгеновской кристаллографии лишь в 2010 году, то есть спустя 83 года после получения ее кристаллов [26].

### Филогенетические исследования структуры уреаз

Уреазы растений и дрожжей являются гомо-олигомерными белками, тогда как бактериальные уреазы представляют собой мультимеры, состоящие из трех субъединиц (*Klebsiella aerogenes* и др.) или из двух (как *Helicobacter pylori*) (рис. 1). Аминокислотные последовательности более мелких субъединиц бактериальных уреаз очень сходны с соответствующими участками в единственной структурной единице эукариотических уреаз [34]. Высокая степень подобия, наблюдаемая среди

аминокислотных последовательностей различных уреаз, предполагает сходство их третичных структур и консервативность их каталитических механизмов [1, 2, 12]. Это подобие также предполагает общее, эволюционно исходное, примитивное структурное состояние уреаз, то есть существование общего для всех уреаз белка-“прародителя” [35]. Каким было примитивное состояние этих ферментов? Был ли ген, кодирующий единственную структурную единицу растительной уреазы, разрезан на множественные гены, кодирующие две или три бактериальные субъединицы, или, наоборот, бактериальные гены слились, чтобы сформировать ген, кодирующий

единственную структурную единицу растительной уреазы? Как показал широкомасштабный филогенетический анализ, проследивший структурный переход от трех-субъединичных уреаз к уреазам с одной структурной единицей, белок-“прародитель” уреаз имел трех-цепочечную организацию, а уреазы с единственной структурной единицей произошли уже от этих уреаз. При этом двух-субъединичные уреазы не являются эволюционно переходным состоянием между ними. Вопрос об их происхождении остается открытым. Возможно, они образовались в результате другого процесса слияния, отличного от изученного [35].

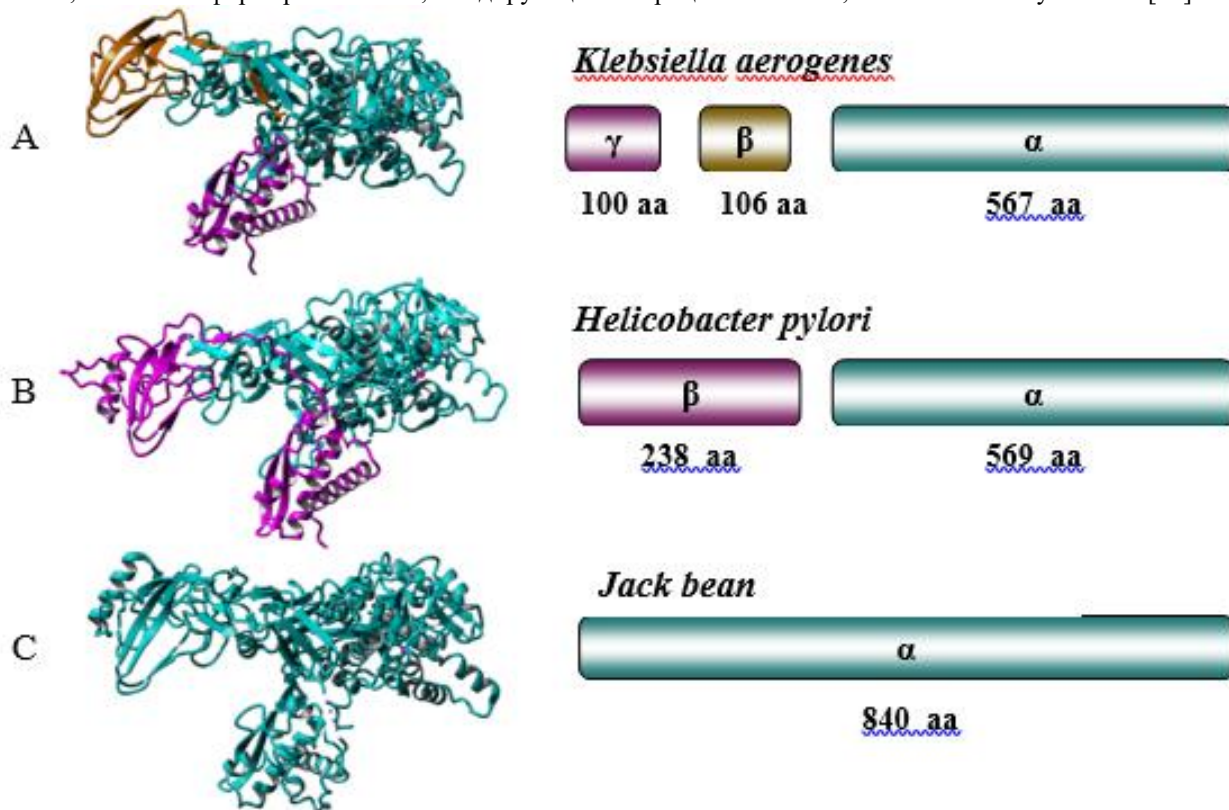


Рис. 1 – Схематическое представление субъединичной организации бактериальных и растительных уреаз и их трехмерная структура, определенная методом рентгеновской кристаллографии. А - типичная микробная уреазы (уреазы *Klebsiella aerogenes*), состоящая из трех субъединиц:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  (PDB код 2KAU). В – уреазы *Helicobacter pylori*, состоящая из двух субъединиц:  $\alpha$  и  $\beta$  (PDB код 1E9Z). С – типичная эукариотическая уреазы (уреазы конских бобов), представленная единственной структурной единицей  $\alpha$  (PDB код 4GY7).

#### Пространственная структура уреаз

Первая молекулярная структура уреазы была получена для микробной уреазы *Klebsiella aerogenes* в 1995 году методом рентгеновской кристаллографии [36, 37]. Эта структура позволила построить первую трехмерную модель этого фермента (PDB код 2KAU) и явилось ключевым этапом в понимании каталитического механизма уреаз. Нативная уреазы *Klebsiella aerogenes* содержит три субъединицы,  $\alpha$  (60.3 kDa, UreC),  $\beta$  (11.7 kDa, UreB) и  $\gamma$  цепи (11.1 kDa, UreA), которые образуют тример  $\alpha\beta\gamma$  (рис. 2) [36]. Структурная единица тример  $\alpha\beta\gamma$  представляет собой Т-образный молекулярный ассоциат размером

75x80x80 Å (рис. 1 и 2), состоящий из четырех структурных доменов: два в  $\alpha$ -цепи, и по одному в  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепях (рис. 3). Все три субъединицы  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  в тримере тесно взаимодействуют друг с другом на площади около 3300 Å<sup>2</sup>, что составляет 10 % от общей площади поверхности  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  субъединиц [36].  $\alpha$ -Цепь содержит активный участок фермента, тогда как  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепи не поставляют никаких аминокислотных остатков в активный центр и выполняют, по-видимому, структурную роль. При этом  $\gamma$ -субъединица может играть важную роль в образовании четвертичной структуры уреазы [38].

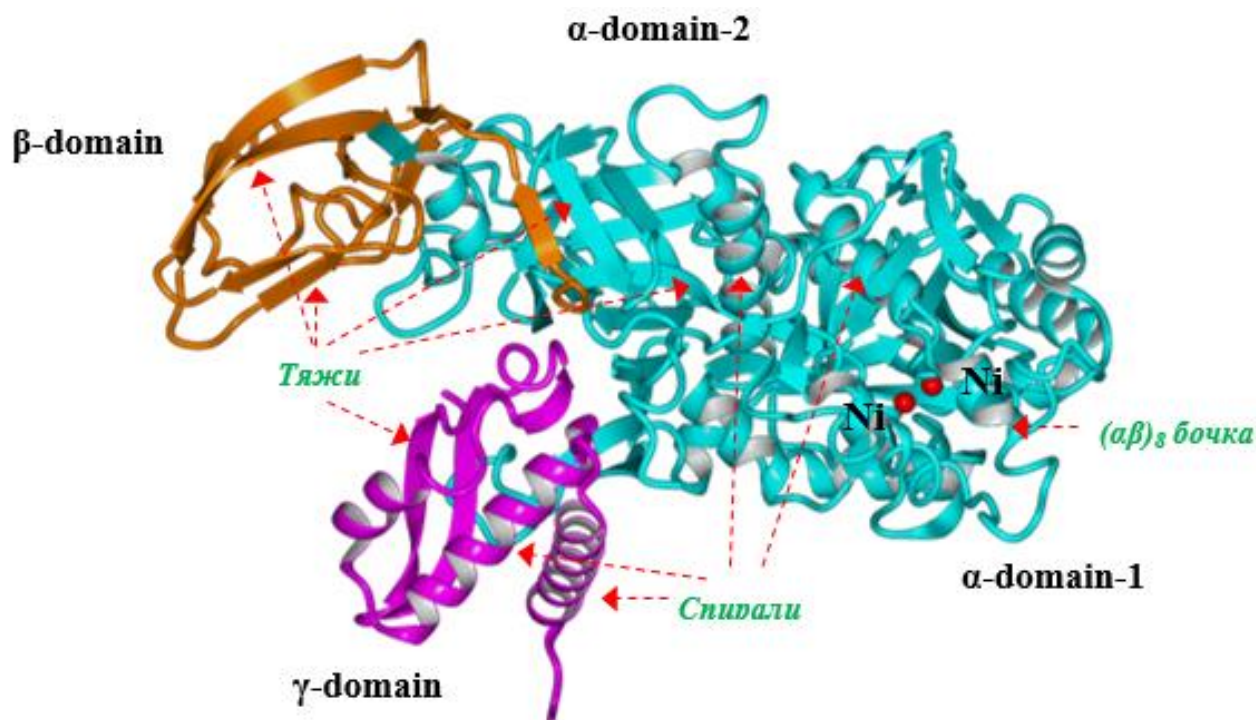


Рис. 2 – Элементы вторичной структуры в трех субъединицах  $\alpha$  (циан (зелено-голубой)),  $\beta$  (светло-коричневый) и  $\gamma$  (магента (светло-пурпурно-красный)) уреазы *Klebsiella aerogenes* (PDB код 2KAU). Ионы Ni окрашены в красный цвет.

Четвертичная структура известных бактериальных уреаз (кроме уреазы *Helicobacter pylori*) формируется в нонамер, состоящий из трех структурных единиц  $\alpha\beta\gamma$  (рис. 2), ассоциированных в тример  $(\alpha\beta\gamma)_3$  (то есть тример из тримеров  $\alpha\beta\gamma$ ), обладающий осью симметрии вращения 3-го порядка (рис. 4). Ассоциат  $(\alpha\beta\gamma)_3$  имеет размеры примерно  $110 \times 110 \times 80$  Å. Поверхность взаимодействия  $(\alpha\beta\gamma)$ -единицы в ассоциате составляет примерно  $19\,000$  Å<sup>2</sup> или 23 % от общей площади ее поверхности. Наличие таких обширных межмолекулярных взаимодействий в нонамерном комплексе может объяснить чрезвычайную биохимическую стабильность уреаз (стойкость к денатурации, нечувствительность конформации и стабильности молекулы к потере ионов, мутациям активного участка и др.) [26, 36, 41].

Активный центр имеет бочкоподобную форму и расположен в  $\alpha 1$ -домене на С-концах тяжей  $(\alpha\beta)_8$  “бочки”, образованной тяжями и спиральями 1-8 (рис. 2 и 3). Спиральный выступ (Н2-Н4) между тяжем 7 и спиралью 7 образует “петлю” поперек активного участка, которая может принимать закрытую, открытую и широко раскрытую конформации, соответственно, закрывая и приоткрывая, и широко раскрывая доступ к активному участку, и тем самым играть ключевую роль в проявлении уреазной активности [39, 40].

На рис. 5 представлен активный центр уреазы *Klebsiella aerogenes* и его расположение в нонамерном ансамбле  $(\alpha\beta\gamma)_3$ . Активный центр уреазы содержит два атома никеля Ni1 и Ni2 и координированные ими аминокислотные остатки His134, His136, Lys217,

His246, His272 и Asp360, и также остатки, вовлеченные в связывание (His219) и катализ (His320). Никелевые центры в тримере  $(\alpha\beta\gamma)_3$  расположены на расстоянии примерно 50 Å друг от друга в  $\alpha$  субъединице каждой  $\alpha\beta\gamma$  единицы. Расстояние между атомами Ni в  $\alpha$  субъединице составляет 3.5 Å. Четвертичная структура уреазы *Helicobacter pylori*, имеющей двух-субъединичное строение (рис. 1B), аналогично трех-субъединичным уреазам (*Klebsiella aerogenes* и др.), представляет собой гетеротримерный ассоциат  $(\alpha\beta)_3$  из структурных единиц  $\alpha\beta$  (рис. 1), имеющий ось симметрии вращения 3-го порядка (рис. 6A) [41]. Однако, в отличие от уреазы *Klebsiella aerogenes*, тримерные ассоциаты  $(\alpha\beta)_3$  далее формируют не тример, а тетрамер из тримеров  $((\alpha\beta)_3)_4$  (рис. 6B-D). При этом центры тримеров располагаются в вершинах правильной треугольной пирамиды, а плоскости тримеров перпендикулярны проходящим через эти вершины осям симметрии треугольной пирамиды. Этот додекамерный сферический ансамбль (рис. 6B-D) имеет массу 1.1 MDa и радиус около 160 Å и содержит 12 каталитических единиц (активных центров). Такой молекулярный дизайн уреазы *Helicobacter pylori* может придавать ей необычайную устойчивость, позволяя эффективно колонизировать в условиях низких pH в процессе колонизации желудка [36]. Интересно, что, в отличие от бактериальных уреаз, четвертичная структура растительных уреаз представлена гексамерным гетероассоциатом: димером из двух тримеров, связанных осью симметрии 2-го порядка (рис. 7).

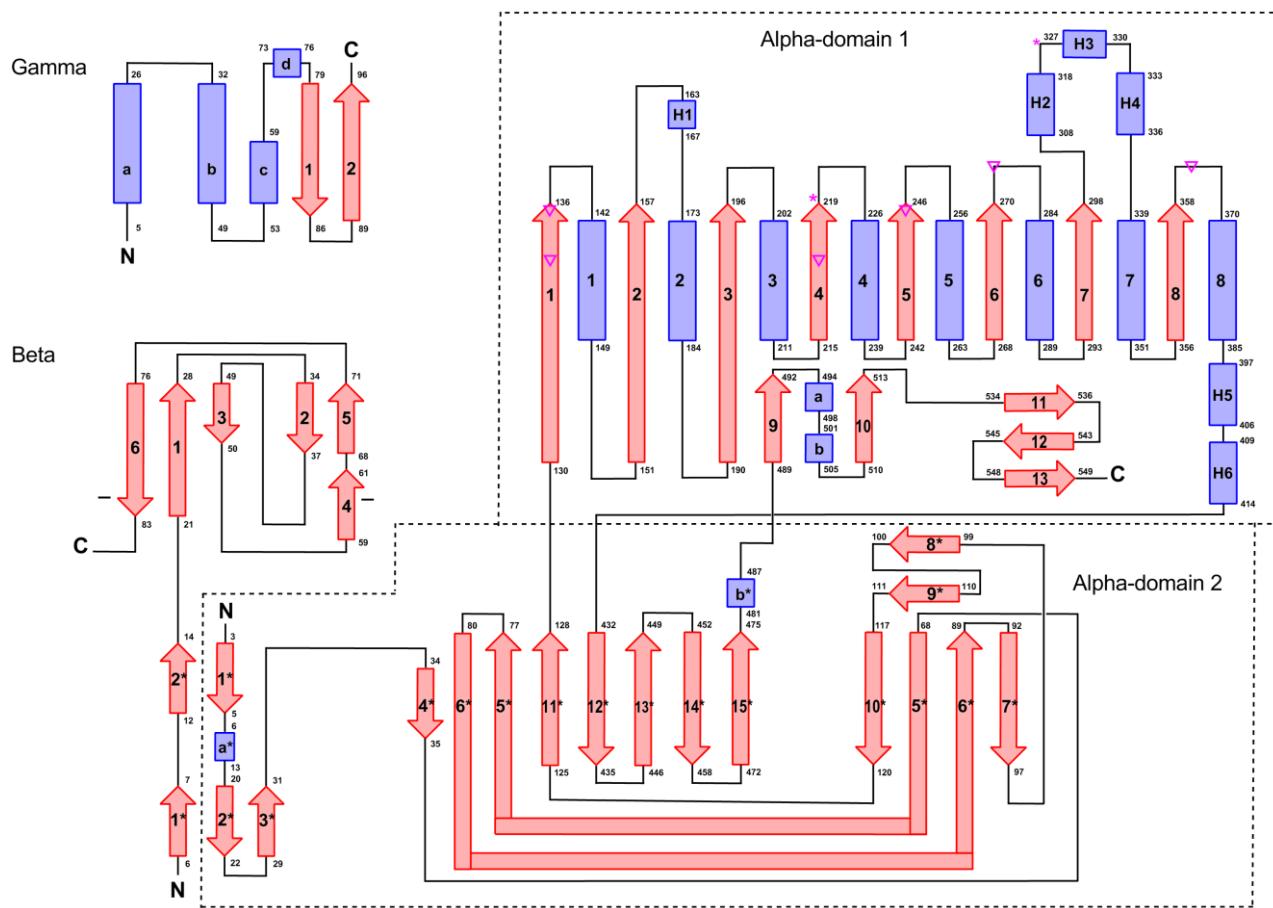


Рис. 3 – Топологическая схема расположения элементов вторичной структуры тримера  $\alpha\beta\gamma$  уреазы *Klebsiella aerogenes* (PDB код 2KAU), включающего в себя четыре структурных домена:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  [36]. Тяжи (красные стрелки) пронумерованы отдельно в каждом домене. Спирали (синие прямоугольники) обозначены буквами, а в  $\alpha 1$ -домене - буквами и буквами с цифрами. Спирали и тяжи в  $\alpha 1$ -домене пронумерованы отдельно. Символы H1-H6 обозначают выступы ( $\alpha\beta$ )<sub>s</sub> бочки, а тяжи и спирали  $\alpha 2$ -домена дополнительно помечены звездочками. Для каждого элемента на топологической схеме указаны номера начального и конечного аминокислотного остатка. В домене  $\alpha 1$  красными перевернутыми треугольниками обозначены положения лигандов никеля (His134, His136, Lys217, His246, His272 и Asp360), а красными звездочками - положения остатков, вовлеченных в связывание (His219) и катализ (His320).

### Активационный комплекс уреазы

Подавляющее большинство уреаз содержат в своем активном центре атомы никеля [26, 30-33]; незначительное исключение составляют уреазы, содержащие железо или цинк [42, 43]. Биохимические и генетические исследования прокариотических и эукариотических уреаз свидетельствуют о том, что для корректной сборки их металлоцентров, для активации уреаз и их надлежащего функционирования необходимы акцессорные белки, уреаз-специфичные шапероны UreD, UreE, UreF и UreG [32, 44, 45]. Предполагаемая модель активации уреазы *Klebsiella aerogenes* представлена на рис. 8 [45-49]. Апопротеин уреазы (то есть фермент без атомов Ni в активном центре) последовательно

связывает акцессорные протеины UreD, UreF и UreG (или уже сформированный их гетеротримерный ассоциат UreDFG), образуя пред-активационный комплекс, в котором ассоциат UreDFG действует как GTP-зависимый молекулярный шаперон, улучшающий экспозицию формирующегося активного участка. UreE взаимодействует с комплексом UreABC-UreDFG и поставляет ионы никеля, выполняя роль металло-шаперона. Для этого ему необходим гидролиз GTP. Двухкись углерода используется для образования карбокси-лизинового лиганда никеля (Lys217, рис. 5). В результате UreE и (UreDFG)<sub>3</sub> высвобождаются из активированной уреазы, содержащей в своем активном центре атомы никеля.

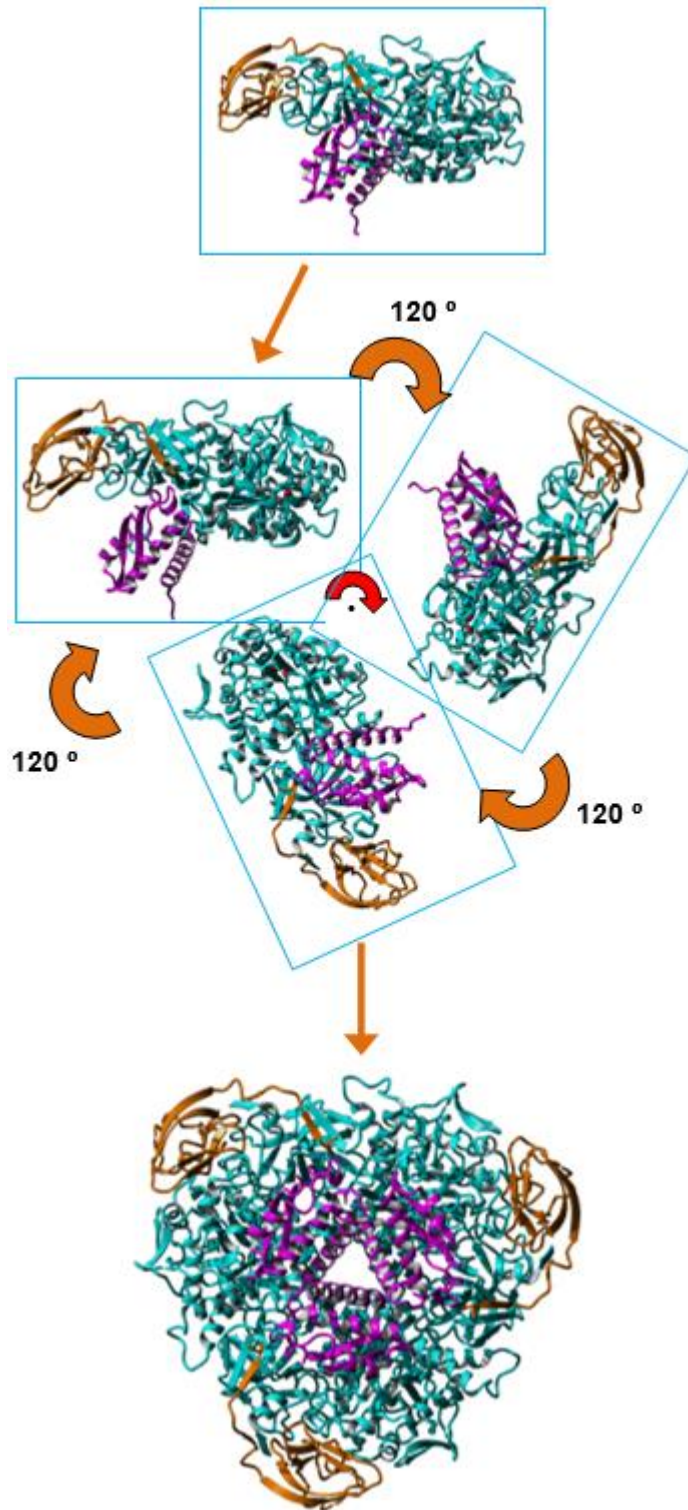


Рис. 4 – Схема строения тримера тримеров  $(\alpha\beta\gamma)_3$  уреазы *Klebsiella aerogenes* (PDB код 2KAU). Тример имеет ось симметрии вращения 3-го порядка. Вращение вокруг оси симметрии показано стрелками. Субъединицы тримера окрашены так же, как и на рис. 1.

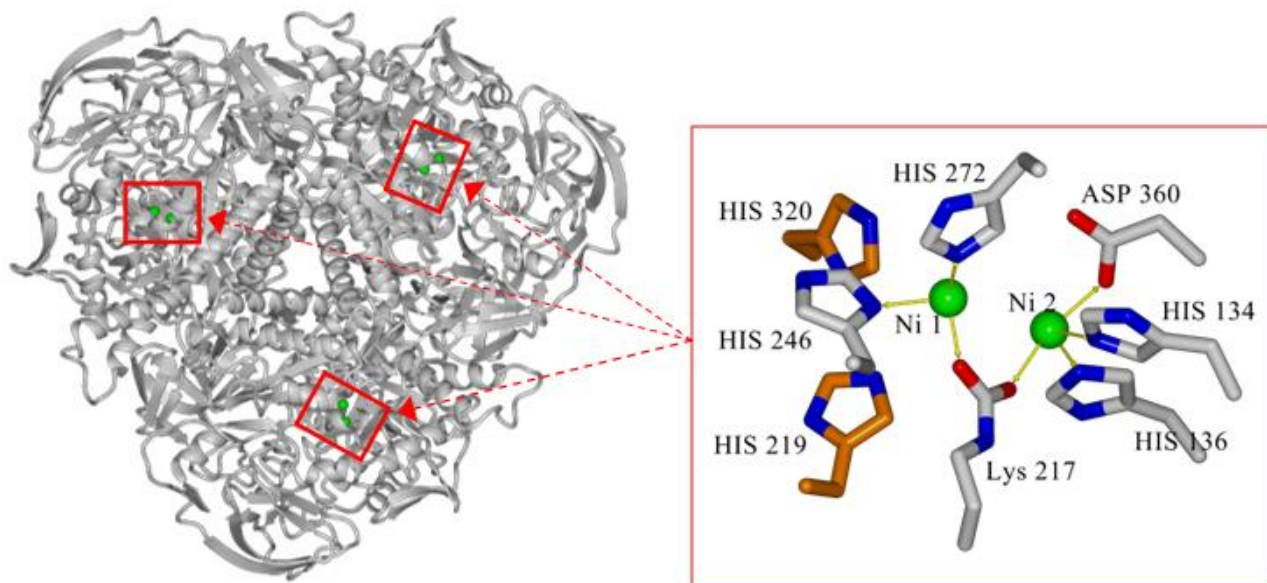


Рис. 5 – Активный центр уреазы *Klebsiella aerogenes* (PDB код 2KAU) и его расположение в нонамерном ансамбле  $(\alpha\beta)_3$ . Атомы никеля Ni1 и Ni2 окрашены в зеленый цвет. Углеродные атомы остатков-лигандов Ni окрашены в серый цвет, а углеродные атомы остатков, участвующих в связывании и катализе, - в светло-коричневый цвет.

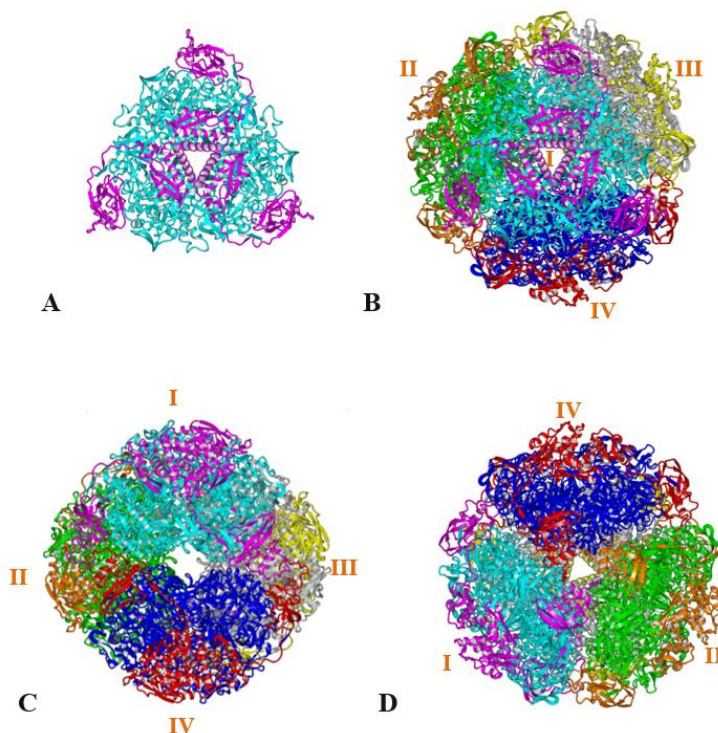


Рис. 6 – Структура тримера  $(\alpha\beta)_3$  уреазы *Helicobacter pylori* (PDB код 1E9Z) и ее додекамерного ассоциата в различных проекциях. А - Тример  $(\alpha\beta)_3$  в проекции, перпендикулярной его оси симметрии вращения 3-го порядка. Субъединицы тримера окрашены так же, как и на рис. 1В. В – Додекамерный ансамбль, тетрамер из тримеров  $((\alpha\beta)_3)_4$  уреазы *Helicobacter pylori*, в проекции, перпендикулярной оси симметрии 3-го порядка тримерной единицы I. Субъединицы первого тримера I окрашены так же, как и на рис. 1В и 6А, а субъединицы остальных тримеров II-IV окрашены в другие цвета. С - Додекамерная структура в проекции, перпендикулярной оси симметрии второго порядка. D- Додекамерная структура в проекции, перпендикулярной оси симметрии 3-го порядка тримерной единицы III (лежащей в плоскости рисунка и прикрытой структурными единицами I, II и IV). Окраска структурных субъединиц на рисунках С и D такая же, как и на рисунке В.

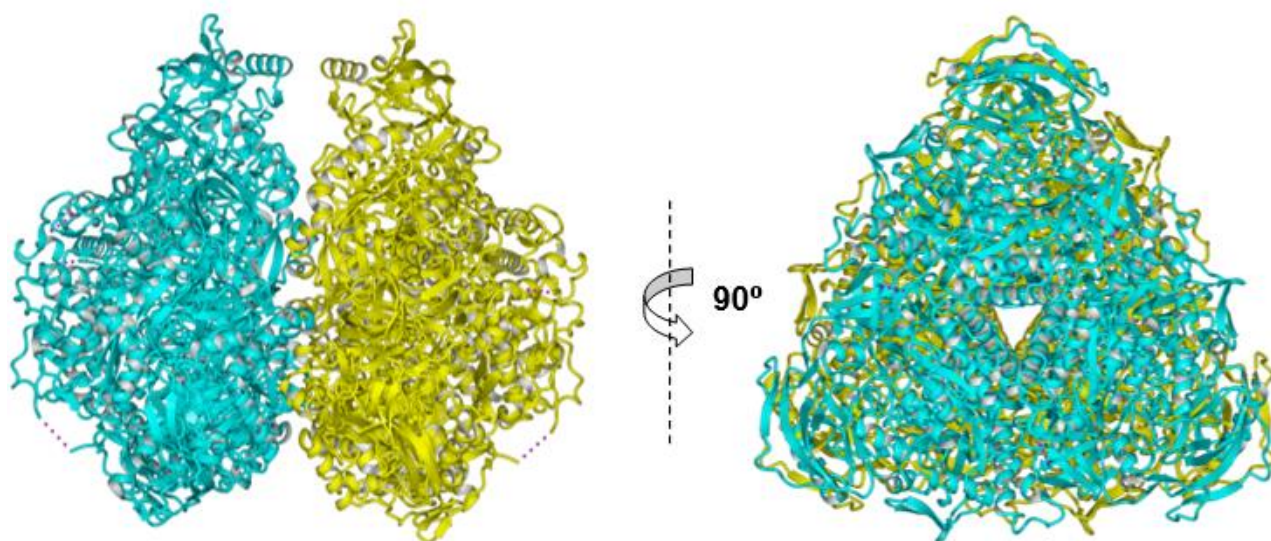


Рис. 7 – Четвертичная структура гексамерного ассоциата  $((\alpha)_3)_2$  растительной уреазы *Canavalia ensiformis* [26] (PDB код 3L4A) в двух проекциях. Субъединицы первого тримера окрашены так же, как и на рис. 1С, а субъединицы второго тримера окрашены в желтый цвет.

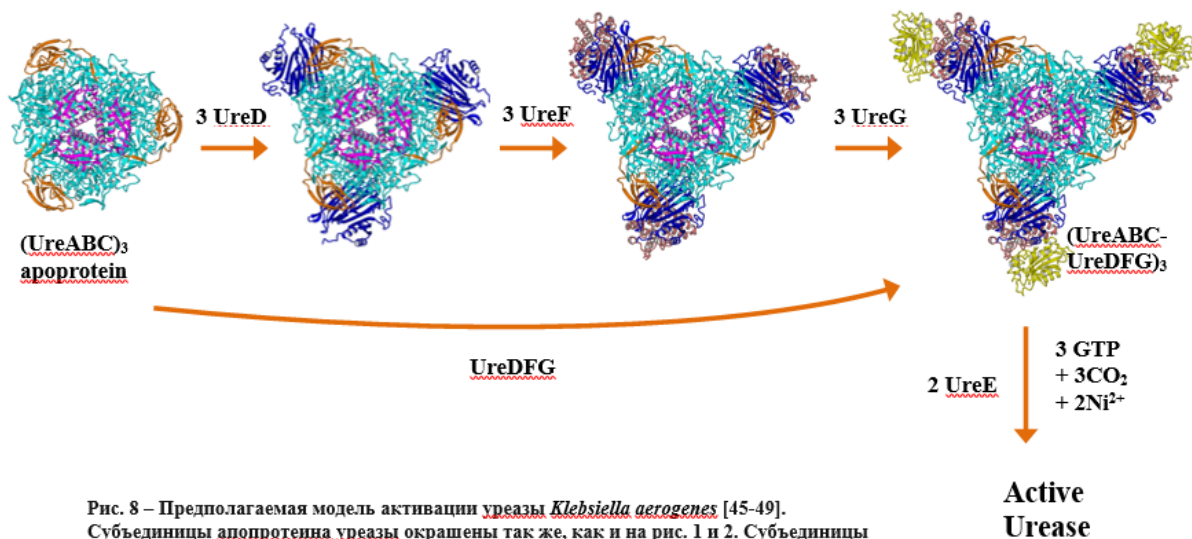


Рис. 8 – Предполагаемая модель активации уреазы *Klebsiella aerogenes* [45-49]. Субъединицы апопротеина уреазы окрашены так же, как и на рис. 1 и 2. Субъединицы аксессуарных протенов UreD, UreF и UreC окрашены, соответственно, в синий, коричневый и желтый цвет.

## Выводы

Понимание структурной организации бактериальных уреаз является необходимым фактором в исследовании структурно-функциональных отношений этих ферментов, механизмов их ферментативной и неферментативной активности, в разработке новых безопасных и эффективных ингибиторов с целью борьбы с инфекционными заболеваниями, обусловленными уреазной активностью.

## References

1. Mobley, H. L. T. Molecular biology of microbial

ureases [Text] / H. T. Mobley, M. D. Island, R. P. Hausinger // Microbiol. Rev. – 1995. – Vol. 59, N 3. – P. 451–480.

2. Mobley, H. L. T. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization [Text] / H. L. T. Mobley, R. P. Hausinger // Microbiol. Rev. – 1989. – Vol. 53, N 1. – P. 85–108.

3. Suzuki, K. Urease-producing species of intestinal anaerobes and their activities [Text] / K. Suzuki, Y. Benno, T. Mitsuoka, S. Takebe, K. Kobashi, J. Hase // Appl. Environ. Microb. - 1979. – Vol. 37, N 3. - P. 379-382.

4. Murchan, S. Emergence, spread, and characterization of phage variants of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 16 in England and Wales [Text] / S. Murchan, H. M. Aucken, G. L. O'Neill, M. Ganner, B. D. Cookson // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42, N 11. – P. 5154-5160.
5. Jin, M. Development of a large-scale HPLC-based purification for the urease from *Staphylococcus leei* and determination of subunit structure [Text] / M. Jin, W. Rosario, E. Watler, D.H. Calhoun // Protein Expr. Purif. – 2004. – Vol. 34, N 1. – P. 111-117.
6. Clemens, D.L. Purification, characterization, and genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* urease, a potentially critical determinant of host-pathogen interaction [Text] / D. L. Clemens, B.-Y. Lee, M. A. Horwitz // J. Bacteriol. – 1995. – Vol. 177, N 19. – P. 5644-5652.
7. Dupuy, B. *Clostridium perfringens* urease genes are plasmid borne [Text] / B. Dupuy, G. Daube, M. R. Popoff, S. T. Cole // Infect. Immun. – 1997. – Vol. 65, N 6. – P. 2313-2320.
- [14] Lam, S.; Yeo, M. Urease-Positive *Vibrio parahaemolyticus* Strain [Text] / S. Lam, M. Yeo // J. Clinical Microbiol. – 1980. – Vol. 12, N 1. – P. 57-59.
8. Futagami, S. Systemic and local immune responses against *Helicobacter pylori* urease in patients with chronic gastritis: distinct IgA and IgG productive sites [Text] / S. Futagami, H. Takahashi, Y. Norose, M. Kobayashi, M. // Gut. – 1998. – Vol. 43, N 2. – P. 168-175.
9. Nakano, M. Association of the urease gene with enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains irrespective of their serogroups [Text] / M. Nakano, T. Iida, M. Ohnishi, K. Kurokawa, A. Takahashi, T. Tsukamoto, T. Yasunaga, T. Hayashi, T. Honda // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39, N 12. – P. 4541-4543.
10. Orth, D. Prevalence, structure and expression of urease genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from humans and the environment [Text] / D. Orth, K. Grif, M. P. Dierich, R. Wurznner // Int. J. Hyg. Environ.-Health. – 2006. – Vol. 209, N 6. – P. 513-520.
11. Konieczna, I. Bacterial ureases and its role in long-lasting human diseases [Text] / I. Konieczna, P. Zarnowiec, M. Kwinkowski, et al. // Curr. Protein. Pept. Sci. – 2012. – Vol. 13. – P. 789-806.
12. Sirko, A. Plant ureases: roles and regulation [Text] / A. Sirko, R. Brodzik // Acta Biochim. Pol. – 2000. – Vol. 47, N 4. – P. 1189-1195.
13. Tange, Y. Identification of the ure1+ gene encoding urease in fission yeast [Text] / Y. Tange, O. Niwa // Curr. Genet. – 1997. – Vol. 32, N 3. – P. 244-246.
14. Zonia, L.E. Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seeds [Text] / L. E. Zonia, N. E. Stebbins, J. C. Polacco // Plant Physiol. – 1995. – Vol. 107, N 4. – P. 1097-1103.
15. Pedrozo, H.A. A mechanism of adaptation to hypergravity in the statocyst of *Aplysia californica* [Text] / H. A. Pedrozo, Z. Schwartz, M. Luther, D. D. Dean, B. D. Boyan, M. L. Wiederhold // Hear Res. – 1996. – Vol. 102, N 1-2. – P. 51-62.
16. McLean, R. J. C. The ecology and pathogenicity of urease-producing bacteria in the urinary tract [Text] / R. J. C. McLean, J. C. Nickel, K.-J. Cheng, J. W. Costerton // CRC Crit. Rev. Microbiol. – 1988. – Vol. 16, N 1. – P. 37-79.
17. Visek, W. J., Effects of urea hydrolysis on cell life-span and metabolism [] / W. J. Visek // Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. – 1972. – Vol. 31. – P. 1178-1193.
18. Visek, W. J. Ammonia: its effects on biological systems, metabolic hormones and reproduction [Text] / W. J. Visek // J. Dairy Sci. – 1984. – Vol. 67, N 3. – P. 481-498.
19. Follmer, C. Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections [Text] / C. Folmer // J. Clin. Pathol. – 2010. – Vol. 63, N 5. – P. 424-430.
20. Burne, R. A. Bacterial ureases in infectious diseases [Text] / R. A. Burne, Y.-Y. M. Chen // Microbes and Infection. – 2000. – Vol. 2. – P. 533-542.
21. Collins, C. M. Bacterial ureases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis [Text] / M. Collins and S. E. F. D'Orazio // Mol. Microbiol. – 1993. – Vol. 9, N 5. P. 907-913.
23. Carlini, C. R. Ureases as multifunctional toxic proteins: A review [Text] / C. R. Carlini, R. Ligabue-Braun // Toxicon. – 2016. – Vol. 110. – P. 90-109.
24. Modolo, L. V. An overview on the potential of natural products as urease inhibitors: a review [Text] / L. V. Modolo, A. X. de Souza, L. P. Horta, D. P. Araujo, A. de Fatima // J. Adv. Res. – 2015. – Vol. 6. – P. 35-44.
25. Wöhler, F. Ueber künstliche bildung des harnstoffs [Text] / F. Wöhler // Ann. Phys. Chem. – 1828. – Vol. 12. – P. 253-256.
26. Balasubramanian, A. Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure [Text] / A. Balasubramanian, K. Ponnuraj // J. Mol. Biol. – 2010. Vol. 400. – P. 274-283.
27. Summner, J. B. The isolation and crystallization of the enzyme urease [Text] / J. B. Sumner // J. Biol. Chem. – 1926. – Vol. 69. – P. 435-441.
28. Фёршт, Э. Структура и механизм действия ферментов [Текст] / Под ред. Б. И. Курганова. – М. : Мир, 1980. – 432 с.
29. Бландел, Т. Кристаллография белка [Текст] / Под Ред. Ю. Т. Стручкова. - М. : Мир, 1979. – 622 с.
30. Dixon, N. E. 1975. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? [Text] / N. E. Dixon, C. Gazzola, R. L. Blakeley, B. Zerner. // J. Am. Chem. Soc. – 1975. – Vol. 97. – P. 4131-4133.
31. Ragsdale, S. W. Nickel-based Enzyme Systems [Text] / S.W. Ragsdale // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284, N 28. – P. 18571-18575.
32. Carter, E. L. Interplay of metal ions and urease [Text] / E. L. Carter, N. Flugga, J. L. Boer, S. B. Mulrooney, R. P. Hausinger // Metallomics. – 2009. – Vol. 1. – P. 207-221.
33. Boer, J. L. Nickel-dependent metalloenzymes [Text] / J. L. Boer, S. B. Mulrooney, R. P. Hausinger // Arch. Biochem. Biophys. – 2014. – Vol. 544. – P. 142-152.
34. Krajewska, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: a review [Text] / J. Mol. Catal. B Enzym. – 2009. – Vol. 59, N 1-3. – P. 9-21.



35. Ligabue-Braun, R. 3-to-1: unraveling structural transitions in ureases [Text] / R. Ligabue-Braun, F. C. Andreis, H. Verli, C. R. Carlini // *Naturwissenschaften*. – 2013. – Vol. 100. – P. 459–467.
36. Jabri, E. The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes* [Text] / E. Jabri, M. B. Carr, R. P. Hausinger, P. A. Karplus // *Science*. – 1995. – Vol. 268, N 5213. – P. 998–1004.
37. Karplus, P.A. 70 years of crystalline urease: what have we learned? [Text] / P. A. Karplus, M. F. Pearson, R. P. Hausinger // *Acc. Chem. Res.* – 1997. – Vol. 30. – P. 330–337.
38. Habel, J. E. Structure of Rv1848 (UreA), the *Mycobacterium tuberculosis* urease gamma subunit [Text] / J. E. Habel, E. H. Bursey, B. S. Rho, et al. // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* – 2010. – Vol. 66, N 7. – P. 781–786.
39. Rjberts, B. P. Wide-open flaps are key to urease activity [Text] / B. P. Roberts, B. R. Miller, A. E. Roitberg, R. M. Merz // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – Vol. 134. – P. 9934–9937.
40. Macomber, L. Reduction urease activity by interaction with the flap covering the active site [Text] / L. Macomber, M. S. Minkara, R. P. Hausinger, K. M. Merz // *J. Chem. Inf. Model.* – 2015. – Vol. 55, N 2. – P. 354–361.
41. Ha, N.-C. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease [Text] / N.-C. Ha, S.-T. Oh, J. Y. Sung, et al. // *Nature Struct. Biol.* – 2001. – Vol. 8. – P. 505–509.
42. Carter, E. L. Iron-containing urease in a pathogenic bacterium [Text] / E. L. Carter, D. E. Tronrud, S. R. Taber, P. A. Karplus, R. P. Hausinger // *P. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2011. – Vol. 108. – P. 13095–13099.
43. Follmer, C. Canatoin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): Biological effects of urease independent of its ureolytic activity [Text] / *Biochem. J.* – 2001. – Vol. 360, N 1. – P. 217–224.
44. Zambelli, B. Chemistry of Ni<sup>2+</sup> in urease: Sensing, trafficking, and catalysis [Text] / *Accounts Chem. Res.* – 2011. – Vol. 44. – P. 520–530.
45. Farrugia1, M. A. Analysis of a soluble (UreD:UreF:UreG)<sub>2</sub> accessory protein complex and its interactions with *Klebsiella aerogenes* urease by Mass Spectrometry [Text] / M. A. Farrugia1, L. Han, Y. Zhong, J. L. Boer, B. T. Ruotolo, R. P. Hausinger // *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* – 2013. – Vol. 24, N 9. – P. 1328–1337.
46. Ligabue-Braun, R. Evidence-based docking of the urease activation complex [Text] / R. Ligabue-Braun, R. Real-Guerra, C. R. Carlini, H. Verli // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2013. – Vol. 31, N 8. – P. 854–861.
47. Quiroz-Valenzuela, S. The structure of urease activation complexes examined by flexibility analysis, mutagenesis, and small-angle X-ray scattering./ S. Quiroz-Valenzuela, S. C. Sukuru, R. P. Hausinger, L. A. Kuhn, W. T. Heller // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2008. – Vol. 480, 51–57.
48. Fong, Y. H. Structure of UreG/UreF/UreH complex reveals how urease accessory proteins facilitate maturation of *Helicobacter pylori* urease [Text] / Y. H. Fong, H. C. Wonh, M. H. Yuen, P. H. Lau et al. // *PLoS Biol.* – 2013. – Vol. 11, N 10. – P. 1–16.
49. Quiroz-Valenzuela, S. The structure of urease activation complexes examined by flexibility analysis, mutagenesis, and small-angle X-ray scattering [Text] / S. Quiroz-Valenzuela, S. C. K. Sukuru, R. P. Hausinger, A. L. A. Kuhn, W. T. Helle // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2008. – Vol. 480, N 1. – P. 51–57.

#### UDC 577.32

#### STRUCTURAL ORGANIZATION OF BACTERIAL UREASES

Lisnyak Yu. V., Martynov A. V.

This brief review concerns the basic principles of structural organization of multi-subunit bacterial ureases and formation of their quaternary structure. Urease is a nickel-containing enzyme (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) that catalyses the hydrolysis of urea to get ammonia and carbamate which then decomposes with water to get ammonia and carbon dioxide. Urease is produced by bacteria, fungi, yeast and plants. On the basis of similarities in amino acid sequences, ureases assumed to have a similar structure and conservative catalytic mechanism. Within past two decades bacterial ureases have gained much attention in research field as a virulence factor in human and animal infections. The first crystal structure of urease has been determined for that from *Klebsiella aerogenes*. The native enzyme consists of three subunits, UreA ( $\alpha$ -chain), UreB ( $\beta$ -chain) and UreC ( $\gamma$ -chain), and contains four structural domains: two in  $\alpha$ -chain ( $\alpha$ -domain 1 and  $\alpha$ -domain-2), one in  $\beta$ - and one in  $\gamma$ -chain. These three chains form a T-shaped heterotrimer  $\alpha\beta\gamma$ . Three  $\alpha\beta\gamma$  heterotrimers form quaternary complex  $(\alpha\beta\gamma)_3$ . In case of *Helicobacter pilori*, the analogous trimers of corresponding dimeric subunits  $(\alpha\beta)_3$  form tetrameric structure  $((\alpha\beta)_3)_4$  in which four trimers are situated at the vertexes of the regular triangle pyramid. Active center is located in  $\alpha$ -domain 1 and contains two atoms of nickel coordinated by residues His134, His136, carboxylated Lys217, His 246, His272 and Asp360, as well as residues involved in binding (His219) and catalysis (His320). Active site is capped by a flap that controls substrate ingress to and product egress from the dinickel center. Urease requires accessory proteins (UreD, UreF, UreG and UreE) for the correct assembly of their Ni-containing metallocenters. The accessory proteins UreD, UreF, and UreG sequentially bind to the apoprotein  $(UreABC)_3$  to finally form  $(UreABC-UreDFG)_3$  activation complex. UreE metallochaperone delivers nickel ions to this complex, UreE and  $(UreDFG)_3$  are then released from the activated enzyme. An understanding of structural organization of bacterial ureases is the necessary factor in the studies of structure-function relationships of these enzymes, mechanisms of their enzyme and non-enzyme activity, in design of new safe and efficient enzyme inhibitors aimed to struggle with infectious diseases promoted by urease activity.

**Key words:** urease, sub-unit organization, quaternary structure, accessory proteins