

УДК 577.152.3.

©Коллектив авторов

ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ L-АСПАРАГИНАЗЫ ИЗ *ERWINIA CAROTOVORA*

**Ю.В. Мезенцев, А.А. Мольнар, О.В. Гнеденко, Ю.В. Красоткина,
Н.Н. Соколов, А.С. Иванов**

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН,
119832, Москва, Погодинская ул., 10; тел.: (495)246-7115; факс.: (495)245-0857;
эл. почта: ivanov@ibmh.msk.su

Препараты бактериальных L-аспарагиназ, катализирующих гидролиз L-аспарагина до L-аспартата и аммиака, используются в практической медицине для лечения острой лимфобластной лейкемии. Длительное терапевтическое применение этих препаратов сопровождается рядом побочных эффектов, обусловленных наличием у фермента глутаминазной активности. Субстратная специфичность и активность L-аспарагиназы напрямую связаны с процессом олигомеризации, поскольку фермент активен только в олигомерной форме (в виде тетрамера), и активные центры расположены в зоне контакта субъединиц. Данная работа посвящена моделированию пространственной структуры L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* на основе гомологии с L-аспарагиназой *Erwinia chrysanthemi*, сравнительному молекулярно-графическому анализу интерфейса между субъединицами этих ферментов, а также разработке подхода для экспериментального изучения процесса олигомеризации фермента. L-аспарагиназа была иммобилизована на поверхности чипа CM5 оптического биосенсора Biacore 3000. С помощью метода поверхностного плазмонного резонанса были зарегистрированы процессы распада тетрамерных комплексов фермента до мономерного состояния и последующего их восстановления.

Ключевые слова: олигомеризация, L-аспарагиназа, *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, компьютерное моделирование, оптический биосенсор.

ВВЕДЕНИЕ. Бактериальные L-аспарагиназы катализируют гидролиз L-аспарагина до L-аспартата и аммиака, однако их субстратная специфичность не высока [1-4]. Они могут гидролизовать, хотя и со значительно меньшей эффективностью, L-глутамин и ряд других соединений [3]. С тех пор, как в работе лаборатории Broome [5] была показана противоопухолевая активность L-аспарагиназы, её препараты стали широко использоваться в медицине как терапевтические средства для лечения острой лимфобластной лейкемии [6-8]. Расщепление аспарагина приводит к уменьшению его периплазматической концентрации. В нормальных клетках недостаток уровня внешнего аспарагина компенсируется работой аспарагинсинтетазы, в тоже время как в лейкозных клетках экспрессия аспарагинсинтетазы снижена [6, 9]. Таким образом, L-аспарагиназа за счет расщепления внешнего аспарагина способна блокировать синтез белка в лейкозных клетках и тем самым вызывать апоптоз опухолевых клеток [6, 7, 9, 10].

К сожалению, медицинское применение препаратов бактериальных L-аспарагиназ сопровождается рядом побочных эффектов. Они обусловлены в основном низкой субстратной специфичностью (главным образом, побочной

глутаминазой активностью) [1, 2, 10], большой молекулярной массой и мультисубъединичной структурой L-аспарагиназы. Иммунная система активно реагирует на появление в крови больного большого количества чужеродного белка с развитием аллергической реакции [11].

Бактериальные L-аспарагиназы существуют в виде гомотетрамера. Четыре активных центра фермента расположены попарно в двух димерах AC и BD на границе между двумя субъединицами каждого димера (рис. 1). Поэтому в отношении структуры данного фермента в литературе часто употребляется термин “димер димеров” [1, 2, 12-15]. Процесс олигомеризации является ключевым в формировании структуры активных центров L-аспарагиназы и ее субстратной селективности. Считается, что L-аспарагиназа активна только в тетрамерной форме [1], хотя предварительный компьютерный анализ структуры показывает, что одного димера, содержащего два активных центра, может быть достаточно для осуществления каталитической функции. Это предположение подтверждается фактом существования активной димерной формы L-аспарагиназы из *E. coli* [16]. В настоящее время активно обсуждается вопрос о создании генно-инженерных модификаций бактериальных L-аспарагиназ для снижения побочных эффектов за счет повышения их субстратной специфичности и контроля олигомеризации. К сожалению, олигомеризация бактериальных L-аспарагиназ изучена крайне слабо. Поэтому сравнительный анализ структуры бактериальных L-аспарагиназ и исследование процесса олигомеризации (как экспериментальными методами, так и методами биоинформатики) представляется крайне важной задачей.

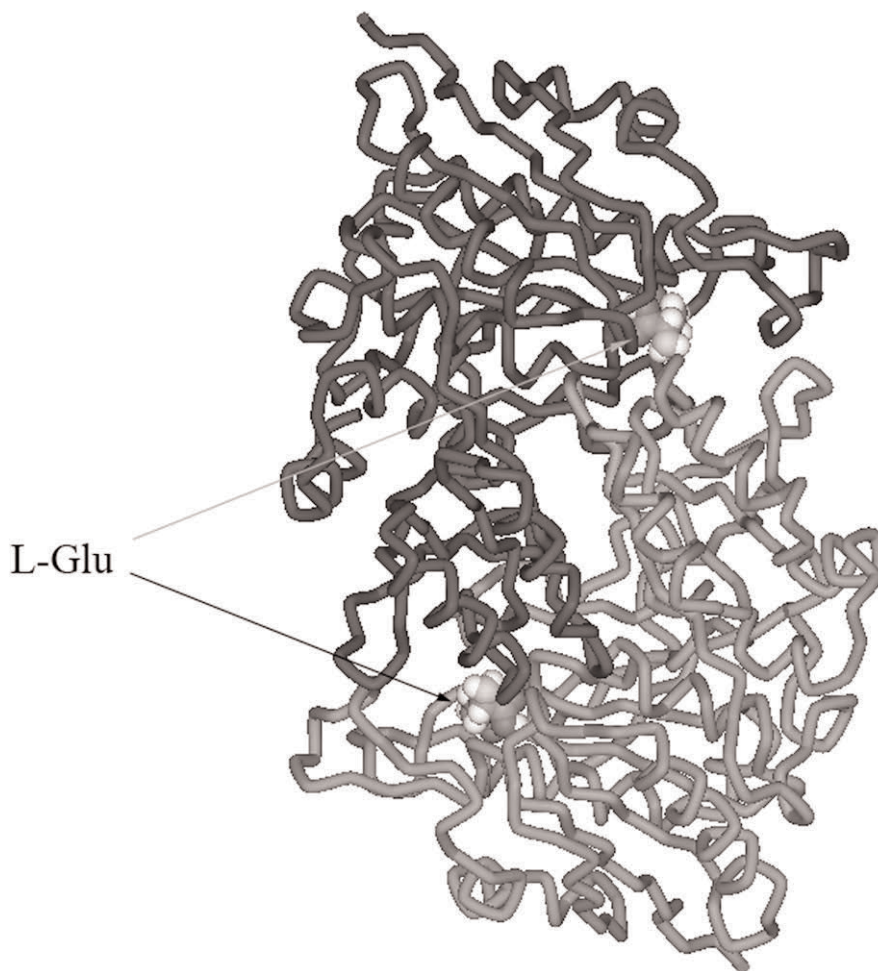


Рисунок 1.

Схематичное изображение димера AC L-аспарагиназы с двумя субстратами (L-Glu) в активных центрах, расположенных в области интерфейса двух субъединиц.

Данная работа была посвящена моделированию пространственной структуры L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* по гомологии с L-аспарагиназой *Erwinia chrysanthemi*, молекулярно-графическому анализу структуры интерфейса между субъединицами этих ферментов и разработке экспериментального подхода для изучения процесса олигомеризации L-аспарагиназы *E. carotovora*.

МЕТОДИКА. Аминокислотная последовательность L-аспарагиназы *E. carotovora* (Q6Q4F4 [2, 17]) была взята на протеомном сервере ExPASy [18]. Аминокислотные последовательности аспарагиназ с известными кристаллическими структурами из разных источников (*E. carotovora*, *E. chrysanthemi*, *Wolinella succinogenes*, *Pseudomonas 7A*, *E. coli*) были взяты из соответствующих файлов белкового банка данных Protein Data Bank (PDB) [24] (PDB индексы: 3ECA [19], 1WSA [20], 4PGA [21], 1O7J [22]). Трехмерные координаты кристаллической структуры L-аспарагиназы *E. chrysanthemi* были получены из банка данных PDB (PDB индексы: 1O7J [22], 1HG1 [1], 1HFW [1], 1HG0 [1], 1HFJ [23], 1HFK [23]).

Реагенты. Следующие растворы и реагенты были получены от Biacore (Швеция): 1) HBS-буфер (150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,005% сурфактанта P20, 10 mM HEPES, pH 7,4); 2) 10 mM ацетатный буфер, pH 4,5; 3) 10 mM глицин-HCl, pH 2,5; 4) набор реагентов для ковалентной иммобилизации лигандов за первичные аминогруппы: EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид), NHS (N-гидроксисукцинимид), этаноламин-HCl.

L-аспарагиназа *E. carotovora* была экспрессирована в *E. coli* и очищена, как описано ранее [14].

Компьютерное моделирование. Сигнальная последовательность фермента была определена с помощью программы SignalP 3.0 Server [25]. Множественное выравнивание последовательностей аспарагиназ из разных источников (*E. carotovora*, *E. chrysanthemi*, *Wolinella succinogenes*, *Pseudomonas 7A*, *E. coli*) с известными трехмерными структурами было выполнено с помощью программы ClustalW 1.83 [26]. Аланиновое сканирование области контактов между мономерами было выполнено на сервере Robetta [27, 28]. С целью выявления важных для межсубъединичного взаимодействия аминокислотных остатков, находящихся в области контактов между двумя димерами, каждый аминокислотный остаток поочередно заменяли на аланин и оценивали изменение энергии взаимодействия димера AC и BD в результате замены:

$$\Delta E_{AB/CD} = (E_{AB/CD} - E_{AC} - E_{BD}) - (E'_{AB/CD} - E'_{AC} - E'_{BD}) [28],$$

где: $E_{AB/CD}$ – изменение энергии связывания димера AC и димера BD до и после замены; $E_{AB/CD}$ – энергия комплекса дикого типа; E_{AC} – энергия димера AC дикого типа; E_{BD} – энергия димера BD дикого типа; $E'_{AB/CD}$ – энергия комплекса мутантного типа; E'_{AC} – энергия димера AC мутантного типа; E'_{BD} – энергия димера BD мутантного типа.

Следующие процедуры были выполнены с помощью программного комплекса Sybyl 6.9.1 (Tripos Inc.) на сервере SGI Origin200 с использованием поля сил Tripos и расчетом зарядов по методу Gasteiger-Huckel [29]: моделирования трехмерной структуры L-аспарагиназы *E. carotovora*; анализ поверхности контакта между субъединицами и оценка энергии межсубъединичного взаимодействия; оптимизация молекулярной модели и моделирование молекулярной динамики структуры L-аспарагиназы.

Минимизация энергии модели L-аспарагиназы *E. carotovora* была выполнена по методу Powell с максимальным числом итераций 600 [30].

Моделирование молекулярной динамики трехмерной модели L-аспарагиназы *E. carotovora* было выполнено в вакууме при постоянной температуре 300°K с продолжительностью 20 пс и шагом 1 фс.

Энергию взаимодействия между мономерами и димерами вычисляли по формуле:

$$E = E_{AB} - (E_A + E_B),$$

где: E – энергии взаимодействия партнера A с партнером B ; E_{AB} – энергия комплекса; E_A – энергия партнера A ; E_B – энергия партнера B .

Для валидации полученной модели были построены карты Рамачандрана для L-аспарагиназ *E. carotovora* и *E. chrysanthemi* с помощью программы PROCHECK 3.4.4 [31]. Также был выполнен сравнительный анализ структур L-аспарагиназы *E. carotovora* и *E. chrysanthemi* с помощью программы LGA (ver. 03/2003) на сайте Protein Structure Prediction Center [32].

Эксперименты по изучению процесса олигомеризации L-аспарагиназы E. carotovora. Эксперименты были выполнены на оптическом биосенсоре Biacore 3000 (“Biacore”), использующем эффект поверхностного плазмонного резонанса для регистрации межмолекулярных взаимодействий [33, 34]. В работе использовали стандартные оптические чипы CM5 с карбоксиметилдекстрановым покрытием.

Иммобилизация L-аспарагиназы E. carotovora на поверхности оптического чипа CM5. Карбоксиметил декстран на поверхности чипа CM5 был активирован путем инъекции смеси 0,2 М EDC /0,05 М NHS в течение 10 мин при скорости 1 мкл/мин с последующей промывкой HBS-буфером при той же скорости в течение 3 мин. Затем осуществляли иммобилизацию L-аспарагиназы за боковые аминогруппы остатков лизина и N-концевой аминокислоты, расположенных на поверхности (рис. 2), путем пропускания раствора белка (5 мкг/мл) в иммобилизационном буфере (10 мМ ацетатный буфер, pH 4,5) в течение 10 мин при скорости потока 1 мкл/мин. Структурно-графический анализ поверхности белка и визуальная оценка позволили определить наиболее доступные аминогруппы для связывания с карбоксиметил-декстраном. NH_2 -группы лизина и N-концевой аминокислоты должны быть ориентированы по отношению к поверхности связывания определенным образом и находиться в доступной области на поверхности белка, что стерически затрудняет иммобилизацию L-аспарагиназы сразу в нескольких местах. Поэтому иммобилизация тетрамера осуществляется преимущественно за одну субъединицу. После иммобилизации L-аспарагиназы пропускание через измерительную кювету рабочего буфера (HBS-буфер) приводит к постепенному снижению сигнала биосенсора. Единственной причиной этого снижения сигнала может быть диссоциация иммобилизованных тетрамеров белка. Если в процессе диссоциации тетрамеров L-аспарагиназы приостановить ток рабочего буфера, наблюдается остановка дрейфа сигнала, это обусловлено быстрым установлением равновесия (тетрамер \leftrightarrow димер \leftrightarrow мономер), сильно смещенным в сторону тетрамеров. При возобновлении тока буфера распад продолжается с уровня сигнала на момент остановки. Поэтому на оптическом чипе иммобилизуются непосредственно тетрамеры белка. Далее карбоксильные группы декстрана, активированные EDC/NHS, но не прореагировавшие с L-аспарагиназой, блокировали путем инъекции 1 М этаноламина (pH 8,5) в течение 7 мин при скорости потока 1 мкл/мин, после чего следовала промывка рабочим буфером. Количество иммобилизованного белка составило 7800 RU, что соответствует примерно 7,8 нг белка/мм² поверхности. Схема иммобилизации представлена на рисунке 3.

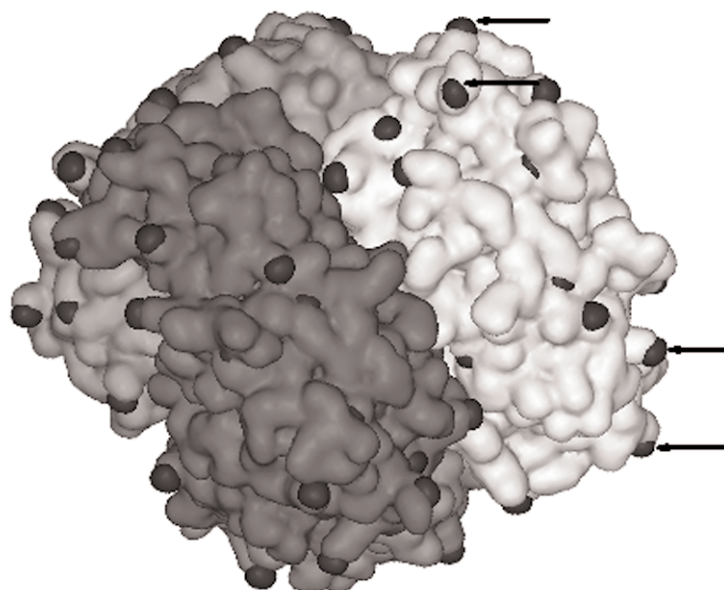


Рисунок 2.

Схематичное изображение тетрамера L-аспарагиназы. Аминогруппы лизина и N-концевого остатка аминокислоты, находящиеся на поверхности белка, выделены черным цветом. Стрелками указаны аминокислоты, за которые L-аспарагиназа может иммобилизоваться.

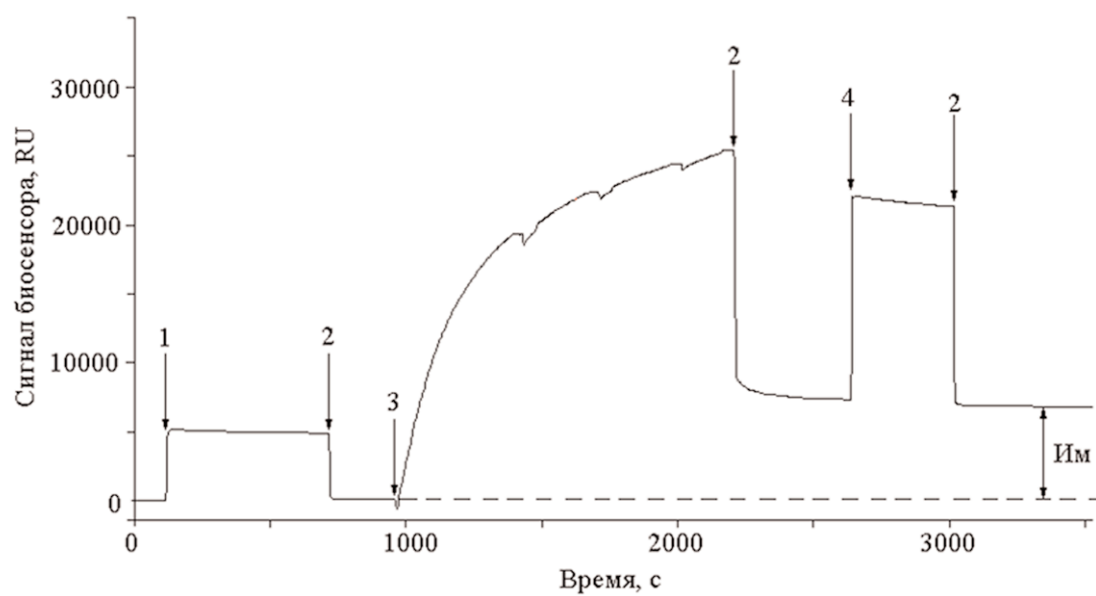


Рисунок 3.

Схема иммобилизации L-аспарагиназы *E. carotovora* на карбоксиметилдекстрановой поверхности чипа CM5. Стрелками обозначены следующие добавки: 1 - 0,2 М EDC / 0,05 М NHS, 2 - HBS-буфер, 3 - раствор L-аспарагиназы (5 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере (pH 4,5), 4 - 1 М раствор этаноламина (pH 8,5), Им - количество иммобилизованного белка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Компьютерное моделирование структуры L-аспарагиназы *E. carotovora*. Так как на момент выполнения работы кристаллическая структура L-аспарагиназы *E. carotovora* еще была неизвестна (кристаллографические данные с разрешением 3 Å для структуры L-аспарагиназы *E. carotovora* были опубликованы в PDB только 18.04.06, PDB индекс 1ZCF [35]), то нашей первоочередной задачей было создание компьютерной трехмерной модели мономера данного фермента. Для этого аминокислотную последовательность, кодирующую структуру мономера (Q6Q4F4), предварительно проанализировали с помощью программы SignalP 3.0 Server, и было выявлено, что фрагмент последовательности MET1-ALA20 является сигнальным. Поэтому в дальнейшей работе из последовательности L-аспарагиназы этот сигнальный пептид был удалён.

Для нахождения наиболее гомологичных L-аспарагиназ из различных источников было выполнено множественное выравнивание их последовательностей с помощью программы ClustalW 1.83. В результате получены числовые оценки гомологии между последовательностями L-аспарагиназы *E. carotovora* и L-аспарагиназ из других источников (табл. 1). Наибольшая гомология наблюдается между L-аспарагиназами *E. carotovora* и *E. chrysanthemi*, парное выравнивание их последовательностей представлено на рисунке 4.

Таблица 1. Оценка гомологии последовательностей L-аспарагиназы *E. carotovora* и L-аспарагиназ из других источников.

SeqA Name	Len (aa)	SeqB Name	Len (aa)	Score
1 Q6Q4F4	327	2 1O7J_A	327	78
1 Q6Q4F4	327	3 3ECA_A	326	48
1 Q6Q4F4	327	5 1WSA_A	330	48
1 Q6Q4F4	327	4 4PGA_A	337	47

Примечание. Таблица была сгенерирована программой ClustalW 1.83. Все параметры программы приняты по умолчанию. SeqA и SeqB - последовательности, между которыми выполняется сравнение. Названия L-аспарагиназ: *E. carotovora* (Q6Q4F4); *E. chrysanthemi* (1O7J_A); *E. coli* (3ECA_A); *Wolinella succinogenes* (1WSA_A); *Pseudomonas* 7A (4PGA_A). Len(aa) - длина аминокислотной последовательности; Score - оценка гомологии между двумя последовательностями.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

Q6Q4F4  AENLPNIVILATGGTIAGSAAANTQT'TGYKAGALGVETLIQAVPELKTLANIKGEQVASI 60
1O7J    ADKLPNIVILATGGTIAGSAAATGT'TGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGEQFSNM 60
*.:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

Q6Q4F4  GSENMSTDVLLTLSKRVNELLARSDDVGVVITHGTDTLDESPLYFLNLTVKSDKPVVFVAA 120
1O7J    ASENMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVGVVITHGTD'TVEESAYFLHLTVKSDKPVVFVAA 120
.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

Q6Q4F4  MRPATAISADGPMNLYGAVKVAADKNSRGRGVLVVLNDRIGSARFISKTNASTLDTFKAP 180
1O7J    MRPATAISADGPMNLLEAVRVAGDKQSRGRGVMVINDRIGSARYITKTNASTLDTFRAN 180
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

Q6Q4F4  EEGYLGVIIGDKIYYQ'TRLDKVHT'TRSVFDVTNVDKLPVDDIIYGYQDDPEYMYDASIKH 240
1O7J    EEGYLGVIIGNRIYYQNRIIDKLH'TRSVFDVRGL'TSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQH 240
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

Q6Q4F4  GVKGIVYAGMGAGSVSKRGDAGIRKAESKGIVVVRSSRTGSGIVPPDAGQPGLVADSLSP 300
1O7J    GVKGIVYAGMGAGSVVRGIAGMRKALEKGVVVMRSTR'TGNGIVPPDEELPGLVSDSLNP 300
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

Q6Q4F4  AKSRILMLALT'TTNPVAVIQDYFHAY 327
1O7J    AHARILMLALT'TSDPKVIQDYFHTY 327
*.:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

```

Рисунок 4.

Парное выравнивание аминокислотных последовательностей L-аспарагиназ *E. carotovora* и *E. chrysanthemi*. Выравнивание выполнено с помощью программы ClustalW 1.83. Все параметры программы приняты по умолчанию.

Моделирование трехмерной структуры было выполнено с помощью программы COMPOSER из программного комплекса Sybyl [29]. Между L-аспарагиназами *E. carotovora* и *E. chrysanthemi* было определено два наиболее гомологичных участка. Для петель с низкой гомологией был выполнен поиск гомологичных структур в базе программы. Далее программой COMPOSER была сгенерирована пространственная структура мономера L-аспарагиназы *E. carotovora* (рис. 5а). Модель тетрамера была получена путем замещения мономеров в кристаллической структуре L-аспарагиназы *E. chrysanthemi* (PDB индекс: 1O7J [20]) на четыре копии мономера L-аспарагиназы *E. carotovora*. Для полученной модели тетрамера L-аспарагиназы *E. carotovora* были выполнены минимизация энергии и моделирование молекулярной динамики с целью оптимизации трехмерной структуры тетрамера. Оптимизированная модель тетрамера L-аспарагиназы *E. carotovora* представлена на рисунке 5б.

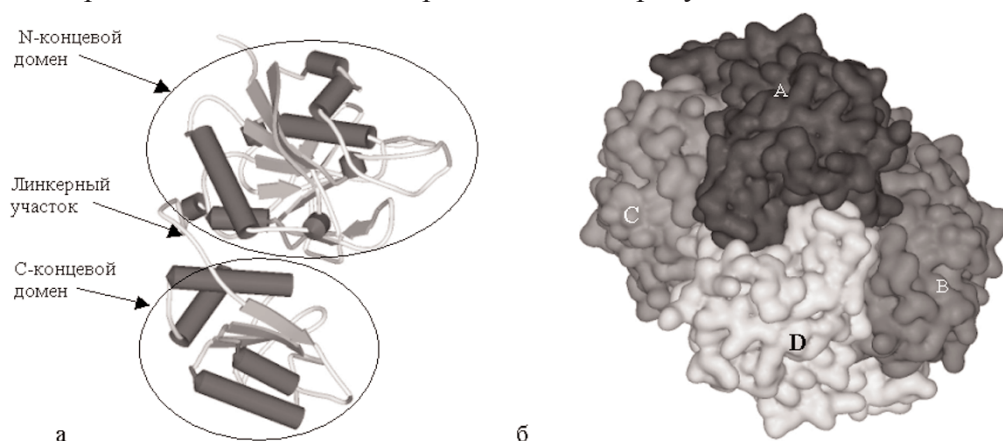


Рисунок 5.

Схематичное изображение мономера L-аспарагиназы (а) и тетрамера (б) L-аспарагиназы (субъединицы обозначены А, В, С, D и отображены разными оттенками серого).

Структурно-графический анализ межсубъединичных контактов в L-аспарагиназе E. carotovora. Нами был выполнен анализ структуры интерфейса между субъединицами и димерами в тетрамере L-аспарагиназы *E. carotovora* и оценен вклад различных видов взаимодействия.

Расчет молекулярных поверхностей для всех возможных контактов между субъединицами в тетрамерах L-аспарагиназ *E. carotovora* и *E. chrysanthemi* и анализ их площади подтвердили общепринятое представление о структуре тетрамера L-аспарагиназы как “димере димеров” (табл. 2).

Таблица 2. Площади контактных поверхностей между субъединицами и димерами в L-аспарагиназах *E. carotovora* и *E. chrysanthemi*.

	<i>E. chrysanthemi</i>	<i>E. carotovora</i>
	Å ²	Å ²
S _{AC-BD}	5655	5891
S _{AB-CD}	9192	9694
S _{AD-BC}	8248	9593
S _{A-B}	1572	1845
S _{A-C}	3276	3705
S _{B-D}	3281	3730
S _{C-D}	1561	1858
S _{A-D}	1977	1885
S _{B-C}	2011	1910

Примечание. Значения площадей контактных поверхностей были получены в программном комплексе Sybyl 6.9.1.

ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ L-АСПАРАГИНАЗЫ ИЗ *ERWINIA CAROTOVORA*

В таблице 3 показаны результаты оценки вклада различных видов межсубъединичного взаимодействия в общую энергию тетрамера и димеров L-аспарагиназ *E. carotovora* и *E. chrysanthemi*.

Таблица 3. Оценка различных видов молекулярных взаимодействий между субъединицами и димерами в L-аспарагиназе.

	<i>E. chrysanthemi</i>				<i>E. carotovora</i>			
	AC	BD	A	C	B	D	A	C
E, ккал/моль	-1255	-565	-591	-1111	-583	-567		
E ₁ , ккал/моль	-285	-212	-218	-275	-214	-216		
E ₂ , ккал/моль	-969	-353	-373	-837	-369	-351		

Примечание. Значения энергии взаимодействий были рассчитаны с помощью программного комплекса Sybyl 6.9.1. E - общая энергия взаимодействия; E₁ - энергия Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий; E₂ - энергия электростатических взаимодействий.

Адекватность полученной виртуальной модели L-аспарагиназы *E. carotovora* была проверена путем построения и анализа карт Рамачандрана и с помощью сравнительного анализа в программе LGA (табл. 4) [32]. Карты Рамачандрана были построены для каждой субъединицы фермента. В виду идентичности полученных карт для всех четырёх субъединиц на рисунке 6 приведена карта Рамачандрана для субъединицы A. На картах для L-аспарагиназ *E. carotovora* и *E. chrysanthemi* значения углов всех аминокислот укладываются в допустимых зонах, исключением является треонин 204. Однако это исключение имеет место в обеих L-аспарагиназах.

Таблица 4. Сравнительный анализ структур L-аспарагиназы *E. carotovora* и *E. chrysanthemi*.

	N1	N2	DIST	N	RMSD	Seq_Id	LGA_S	LGA_Q
SUMMARY (LGA)	1308	1300	5,0	1300	0,99	78,46	96,686	119,207

Примечание. Сравнительный анализ был выполнен с использованием программы LGA [31]. Все параметры программы приняты по умолчанию. N1 – количество остатков аминокислот L-аспарагиназы *E. carotovora*; N2 – количество остатков аминокислот L-аспарагиназы *E. chrysanthemi*; DIST – порог отсеивания; N – количество совпадающих аминокислот при заданном пороге отсеивания; RMSD – среднеквадратичное отклонение, рассчитанное для совпадающих аминокислот; Seq_Id – показатель гомологичности между собой аминокислотных последовательностей; LGA_S – оценка пространственного соответствия структур L-аспарагиназы *E. carotovora* и L-аспарагиназы *E. chrysanthemi* с учетом числа аминокислотных остатков в последней; LGA_Q – качественная оценка, рассчитанная по формуле: $Q=0,1 \cdot N/(0,1+RMSD)$.

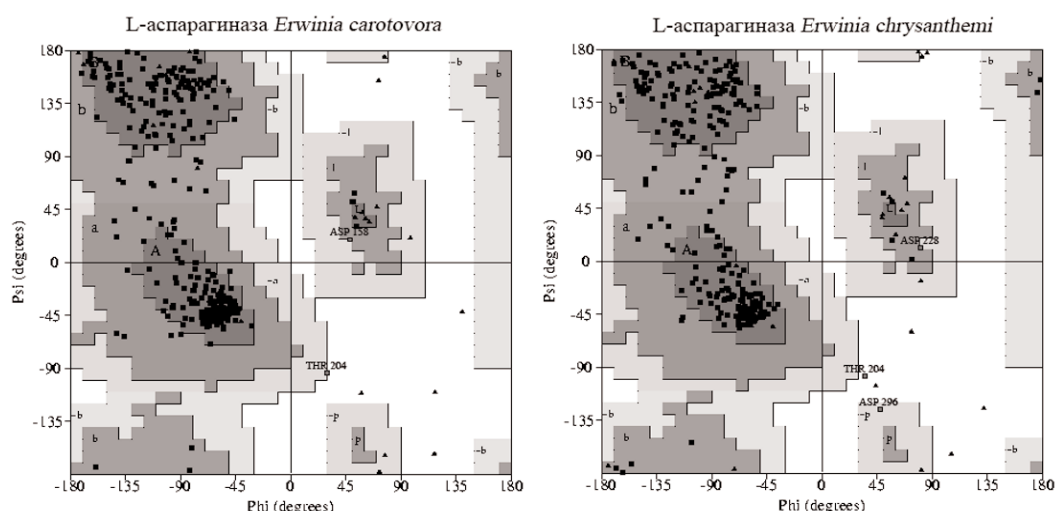


Рисунок 6.

Карты Рамачандрана для L-аспарагиназы *E. carotovora* (слева) и *E. chrysanthemi* (справа). Пространство карты разбито на четыре основные зоны: предпочитаемая (темно-серая), разрешенная (серая), допустимая (светло-серая) и запрещенная (белая).

Для оценки вклада различных аминокислот, формирующих область контакта между двумя димерами AC и BD в L-аспарагиназе *E. carotovora*, было выполнено аланиновое сканирование данного интерфейса. Полученные данные (табл. 5) показали, что основной вклад во взаимодействие между димерами AC и BD вносят остатки заряженных аминокислот: аргинина (R122, R159, R198), аспартата (D158, D175) и глутамата (E181, E182). Таким образом, между димерами AC и BD преобладает электростатическое взаимодействие, что согласуется с данными, приведенными в таблице 3. Следовательно, можно сделать заключение, что аминокислоты из этого ряда должны учитываться в дальнейших генно-инженерных работах по созданию модифицированных форм L-аспарагиназа.

Таблица 5. Влияние замены аминокислот на аланин, формирующих интерфейс двух димеров AC и BD в L-аспарагиназе *E. carotovora*, на стабильность тетрамера ABCD.

pdb#	Chain	aa	ΔE_{ABCD} , ккал/моль	pdb#	Chain	aa	ΔE_{ABCD} , ккал/моль
122	A	R	1,4	122	B	R	1,41
127	A	I	2,02	127	B	I	1,99
133	A	M	1,07	133	B	M	1,07
157	A	N	1,85	157	B	N	1,83
158	A	D	1,1	158	B	D	1,09
159	A	R	3,05	159	B	R	2,82
175	A	D	4,44	175	B	D	4,46
181	A	E	2,77	181	B	E	2,79
182	A	E	1,26	182	B	E	1,25
194	A	Y	1,73	194	B	Y	1,76
198	A	R	1,57	283	B	I	1,57
283	A	I	1,58	297	B	S	2,65
297	A	S	2,61	122	D	R	1,35
122	C	R	1,2	127	D	I	2,07
127	C	I	2,02	133	D	M	1,04
133	C	M	1,07	157	D	N	1,84
157	C	N	1,84	159	D	R	3,04
158	C	D	1,06	175	D	D	4,46
159	C	R	3,05	181	D	E	2,73
175	C	D	4,46	182	D	E	1,29
181	C	E	2,77	194	D	Y	1,77
182	C	E	1,23	283	D	I	1,54
194	C	Y	1,76	297	D	S	2,67
283	C	I	1,56				
297	C	S	2,57				

Примечание. Аланиновое сканирование было выполнено на сервере Robetta [27, 28]. pdb# - номер аминокислоты в PDB файле белка; Chain – субъединица L-аспарагиназы, в которой производится замена; aa – заменяемая аминокислота; ΔE_{ABCD} - изменение энергии связывания димера AC и димера BD в результате замены.

Поскольку при работе над статьёй в белковом банке данных PDB появилась кристаллическая структура L-аспарагиназы *E. carotovora* (PDB индекс: 1ZCF [35]), представлялось актуальным сравнение нашей компьютерной модели

ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ L-АСПАРАГИНАЗЫ ИЗ *ERWINIA CAROTOVORA*

L-аспарагиназы *E. carotovora* с ее кристаллической структурой. Величина RMSD и значения попарных расстояний между C атомами в мономере при наложении одной структуры на другую представлены на рисунке 7. Полученные результаты указывают на достоверное предсказание трехмерной структуры L-аспарагиназы *E. carotovora*, что обусловлено высокой степенью гомологии с белком-образцом (L-аспарагиназа *E. chrysanthemi*). Таким образом, использование компьютерного моделирования по гомологии является целесообразным при отсутствии трехмерных структур L-аспарагиназ.

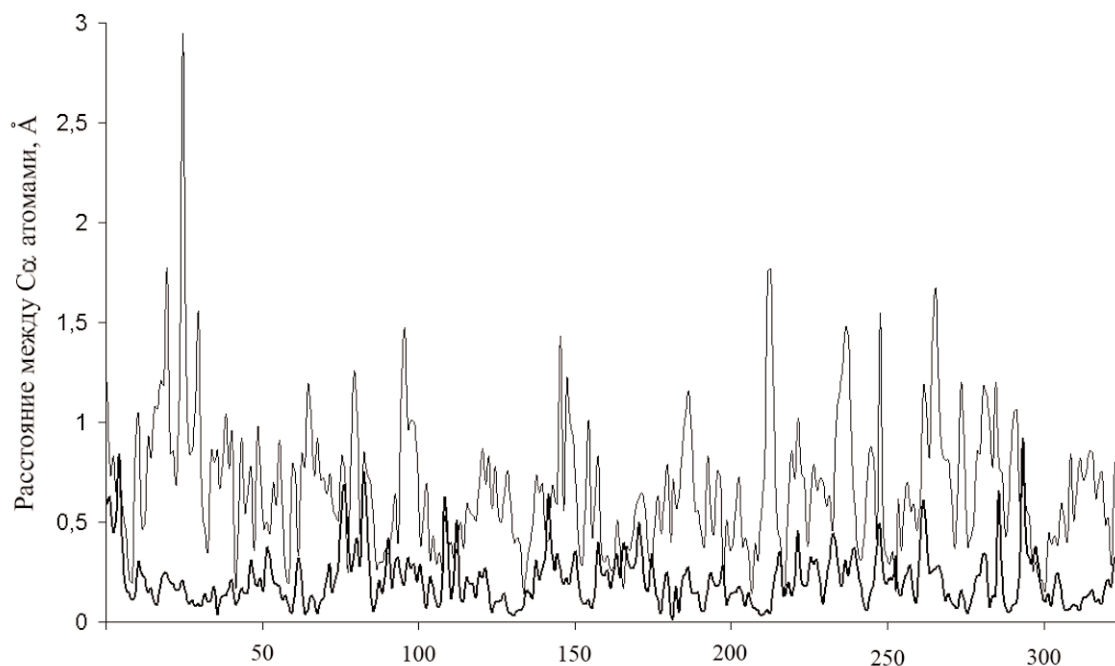


Рисунок 7.

Попарные расстояния между Cα атомами в субъединице A у компьютерной модели и кристаллической структуры L-аспарагиназы *E. carotovora* (жирная линия); кристаллических структур L-аспарагиназ *E. carotovora* и *E. chrysanthemi* (тонкая линия).

Изучение процессов диссоциации и олигомеризации L-аспарагиназы E. carotovora. После иммобилизации L-аспарагиназы наблюдался процесс самопроизвольного распада тетрамеров фермента при длительном пропускании HBS-буфера через измерительную кювету (рис. 8). Через несколько дней уровень сигнала биосенсора снизился примерно в 4 раза. Можно предположить, что четырехкратное снижение уровня сигнала прибора свидетельствует о распаде тетрамеров до мономеров. Таким образом, подтверждается заключение, сделанное в начале работы, о том, что L-аспарагиназа иммобилизуется исключительно через одну субъединицу. При пропускании 10 мМ раствора глицин-HCl (pH 2,5) интенсивность распада тетрамеров резко увеличивалась. Восстановление тетрамеров L-аспарагиназы на поверхности оптического чипа было осуществлено путем пропускания раствора L-аспарагиназы в иммобилизационном буфере (10 мМ ацетатный буфер, pH 4,5), что привело к резкому повышению концентрации белка на поверхности чипа за счет электростатического взаимодействия положительно заряженного белка с отрицательно заряженной поверхностью чипа. В растворе L-аспарагиназы существует равновесие тетрамер \leftrightarrow димер \leftrightarrow мономер. При пропускании раствора через измерительную кювету оптического биосенсора происходит захват иммобилизованными мономерами субъединиц L-аспарагиназы из раствора до полного восстановления тетрамеров, что сопровождается увеличением уровня сигнала биосенсора. После промывки HBS-буфером уровень сигнала биосенсора

возрастал в 4 раза, что свидетельствует о произошедшей олигомеризации фермента с восстановлением его тетрамерной формы (рис. 9). Эксперименты по разрушению тетрамеров L-аспарагиназы до мономеров с последующим их восстановлением удавалось многократно повторять на одном оптическом чипе. Специфичность процесса олигомеризации L-аспарагиназы на данный момент не проверялась. В дальнейшем планируется постановка таких контрольных экспериментов.

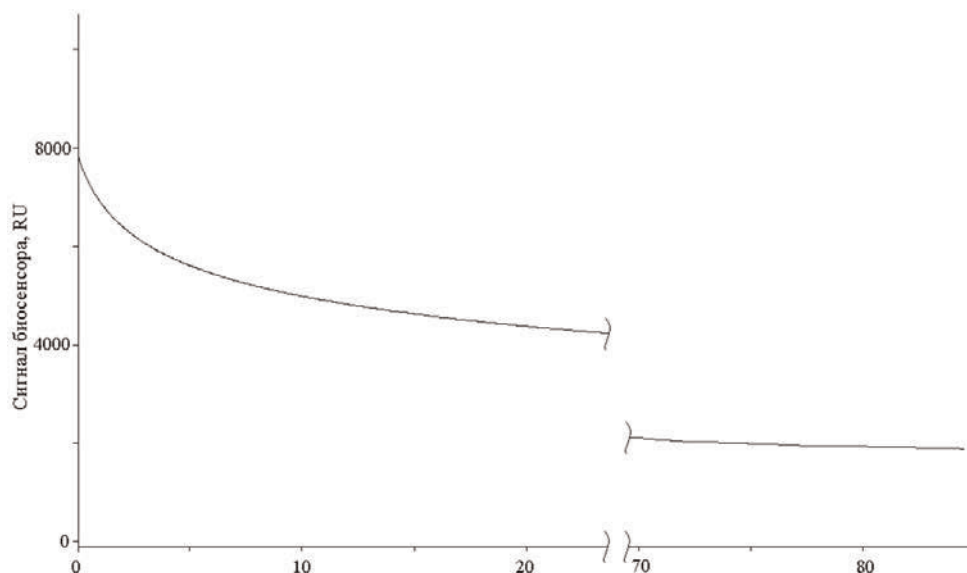


Рисунок 8.

Самопроизвольный распад тетрамеров L-аспарагиназы при пропускании HBS-буфера (скорость потока 1 мкл/мин).

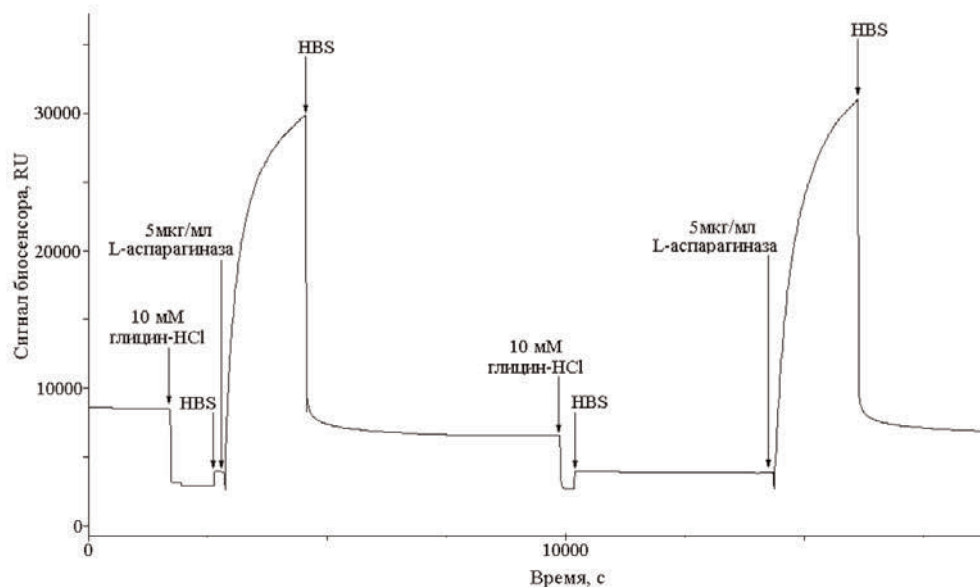


Рисунок 9.

Распад тетрамеров L-аспарагиназы при пропускании 10 мМ раствора глицин-HCl (pH 2,5) (скорость потока 1 мкл/мин) и последующая олигомеризация фермента при пропускании раствора L-аспарагиназы в 10 мМ ацетатном буфере (pH 4,5) (скорость потока 1 мкл/мин).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. С помощью компьютерного моделирования была построена трехмерная модель L-аспарагиназы *E. carotovora*. Поскольку на момент написания статьи в белковой базе данных PDB появилась кристаллическая структура L-аспарагиназы *E. carotovora*, то был выполнен ее сравнительный анализ с моделью путем оценки расстояний между C атомами при совмещении структур. Значения RMSD и расстояния между C атомами указывают на адекватность модели белка. Таким образом, можно сделать вывод, что в дальнейшем возможно использование компьютерного моделирования для получения новых L-аспарагиназ на основе гомологии с L-аспарагиназами с известными структурами.

В результате компьютерного анализа области контакта между субъединицами было установлено, что в тетрамере L-аспарагиназы электростатические взаимодействия являются доминирующими. Наибольшее значение в стабилизации четвертичной структуры фермента имеют следующие аминокислотные остатки: аргинин (R122, R159, R198), аспартат (D158, D175) и глутамат (E181, E182). В дальнейшем планируется постановка экспериментов по влиянию ионной силы на устойчивость тетрамерной формы L-аспарагиназы.

В экспериментах на оптическом биосенсоре Biosore 3000 удалось осуществить иммобилизацию тетрамеров L-аспарагиназы на поверхности чипа CM5, зарегистрировать распад тетрамерной формы фермента и осуществить последующее восстановление тетрамеров. Цикл распада и восстановления тетрамеров L-аспарагиназы многократно воспроизводится на одном оптическом чипе. Разработанная методика может служить основой для выполнения в дальнейшем работ по изучению взаимодействия низкомолекулярных лигандов с иммобилизованным ферментом, а также процессов олигомеризации генно-инженерных модификаций L-аспарагиназы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 04-04-49085).

ЛИТЕРАТУРА

1. Aghaiypour K., Wlodawer A., Lubkowski J. (2001) *Biochem.*, **40**, 5655-5664.
2. Kotzia G.A., Labrou N.E. (2005) *J. Biotechnology*, **119**, 309-323.
3. Howard J.B., Carpenter F.H. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 1020-1030.
4. Derst C., Henseling J., Ruhm K.-H. (2000) *Protein Science*, **9**, 2009-2017.
5. Schwartz J.H., Reeves J.Y., Broome J.D. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **56**, 1516-1519.
6. Pinheiro J.P., Boos J. (2004) *Br. J. Haematol.*, **125**, 117-127.
7. Rizzari C., Zucchetti M., Conter V., Diomede L., Bruno A., Gavazzi L., Paganini M., Sparano P., Lo Nigro L., Arico M., Milani M., D'Incalci M. (2000) *Ann. Oncol.*, **11**, 189-193.
8. Соколов Н.Н., Эльдаров М.А., Сидорук К.В., Жгун А.А., Борисова А.А., Александрова С.С., Омелянюк Н.М., Богуш В.Г., Красоткина Ю.В., Гервазиев Ю.В., Покровская М.В., Соков Б.Н., Березов Т.Т., Скрябин К.Г., Арчаков А.И. (2005) *Молекулярная медицина*, **1**, 45-53.
9. Cammack K.A., Marlborough D.I., Miller D.S. (1972) *Biochem. J.*, **126**, 361-379.
10. Muller H.J., Beier R., Loning L., Blutters-Sawatzki R., Dorffel W., Maass E., Muller-Weihrich S., Scheel-Walter H.G., Scherer F., Stahnke K., Schrappe M., Horn A., Lumkemann K., Boos J. (2001) *Br. J. Haematol.*, **114**, 794-799.
11. Goodsell D.S. (2005) *Stem cell*, **23**, 710-711.
12. Marlborough D.I., Miller D.S., Cammack K.A. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **386**, 576-589.
13. Shifrin S., Parrott C.L., Luborsky S.W. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 1335-1340.

14. *Krasotkina J., Borisova A.A., Gervaziev Yu.V., Zanin A.S., Sokolov N.N.* (2004) *Biotechnol. Applied Biochem.*, **39**, 215-221.
15. *Lubkowski J., Dauter M., Aghaiypour K., Wlodawera A., Dauter Z.* (2003) *Acta Cryst.*, **59**, 84-92.
16. *Borek D., Jaskolski M.* (2001) *Acta Biochim. Pol.*, **48**, 893-902.
17. *Bell K.S., Sebaihia M., Pritchard L., Holden M.T.G., Hyman L.J., Holeva M.C., Thomson N.R., Bentley S.D., Churcher L.J.C., Mungall K., Atkin R., Bason N., Brooks K., Chillingworth T., Clark K., Doggett J., Fraser A., Hance Z., Hauser H., , Toth I.K.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 11105-11110.
18. *Apweiler R., Bairoch A., Wu C.H.* (2004) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8**, 76-80.
19. *Swain A.L., Jaskolski M., Housset D., Rao J.K., Wlodawer A.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1474-1478.
20. *Lubkowski J., Palm G.J., Gilliland G.L., Derst C., Rohm K.H., Wlodawer A.* (1996) *Eur.J.Biochem.*, **241**, 201-207.
21. *Jakob C.G., Lewinski K., LaCount M.W., Roberts J., Lebioda L.* (1997) *Biochem.*, **36**, 923-931.
22. *Lubkowski J., Dauter M., Aghaiypour K., Wlodawer A., Dauter Z.* (2003) *Acta Crystallogr. Sect. D*, **59**, 84.
23. *Jaskolski M., Kozak M., Lubkowski J., Palm G., Wlodawer A.* (2001) *Acta Crystallogr. Sect. D*, **57**, 369-377.
24. *Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E.* (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, 235-242.
25. *Jannick Dyrlov Bendtsen, Henrik Nielsen, Gunnar von Heijne, Soren Brunak* (2004) *J. Mol. Biol.*, **340**, 783-795.
26. *Higgins D., Thompson J., Gibson T. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.* (1994) *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.
27. *Kortemme T., Kim D.E., Baker D.* (2004) *Sci. STKE*, **219**, 12.
28. *Kim D.E., Chivian D., Baker D.* (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 526-531.
29. *Sybyl 6.9, Tripos Inc.,* (1999) South Hanley Road, St Louis, Missouri, 63144, USA.
30. *Powell M.J.D.* (1977) *Mathematical Programming*, **12**, 241-254.
31. *Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S., Thornton J. M.* (1993) *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-291.
32. *Zemla A.* (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3370-3374.
33. *Myszka D.G.* (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 50 –57.
34. *Jonsson U., Fagerstam L., Ivarsson B., Johnsson B., Karlsson R., Lundh K., Lofas S., Persson B., Roos H., Ronnberg I., Sjolander R., Stenberg E., Stahlberg R., Urbaniczky C., Ostlin H., Malmqvist M.* (1991) *BioTechniques*. **11**, 620–627.
35. *Кислицын Ю.А., Кравченко О.В., Никонов С.В., Куранова И.П.* (2006) *Кристаллография*, **51**. (в печати).

Поступила: 14. 11. 2005

OLIGOMERIZATION OF L-ASPARAGINASE FROM *ERWINIA CAROTOVORA*

Y.V. Mezentsev, A.A. Molnar, O.V. Gnedenko, Y.V. Krasotkina, N.N. Sokolov, A.S. Ivanov

V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya ul., 10, Moscow,
119121 Russia; fax: 7 (495) 245-0857; e-mail: ivanov@ibmh.msk.su

Bacterial L-asparaginases catalyzing hydrolysis of L-asparagine up to L-aspartate and ammonia, are used in medical practice for treatment of acute lymphoblastic leukemia. The long-term therapy with these preparations is accompanied by a number of side effects, which are attributed to glutaminase activity of L-asparaginase. Substrate specificity and activity of L-asparaginases are directly associated with the process of enzyme oligomerization. It is active only in the tetrameric form as the active sites are located in contact areas between monomers. The present work is devoted to homology modeling of spatial structure of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*, the comparative molecular-graphic analysis of subunits interfaces, as well as development of experimental approach for enzyme oligomerization study. L-asparaginase was immobilized on a CM5 chip surface of optical biosensor Biacore 3000 based on the surface plasmon resonance technology. The dissociation process of enzyme tetrameric complexes up to monomers and subsequent oligomerization process have been registered.

Key words: oligomerization, L-asparaginase, *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, computer modeling, optical biosensor Biacore 3000.