

УДК 577.152.3

© Коллектив авторов

СПЕЦИФИЧНОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНОГО УЗНАВАНИЯ ПРИ ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ L-АСПАРАГИНАЗ

*Ю.В. Мезенцев*¹, А.А. Мольнар¹, Н.Н. Соколов¹, В.Б. Лисицына²,
М.А. Шатская², А.С. Иванов¹, А.И. Арчаков¹*

¹Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10; тел.: 8(499)246-71-15; эл. почта: yuri.mezentsev@ibmc.msk.ru

²Российский государственный медицинский университет им. Н.И. Пирогова, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

Бактериальные L-аспарагиназы (LA), используемые в качестве противоопухолевых препаратов, проявляют свою активность только в виде гомотетрамеров, поскольку активные центры в этих ферментах расположены в зоне контакта субъединиц. Высокая стабильность тетрамерных комплексов аспарагиназ обусловлена образованием ионных пар между субъединицами, что должно приводить и к высокой специфичности молекулярного узнавания при олигомеризации этих ферментов. В данной работе мы изучали специфичность молекулярного узнавания при олигомеризации ряда бактериальных LA с помощью оптического биосенсора, работающего на эффекте поверхностного плазмонного резонанса. Была обнаружена практически абсолютная специфичность молекулярного узнавания - устойчивые тетрамерные комплексы образовывались только из субъединиц одного вида. На примере двух мутантных вариантов LA *Helicobacter pylori* было показано, что специфичность молекулярного узнавания заметно снижается при наличии даже одной точечной мутации в зоне контакта субъединиц высоко гомологичных близкородственных ферментов.

Ключевые слова: специфичность, молекулярное узнавание, олигомеризация, L-аспарагиназа, компьютерное моделирование, оптический биосенсор, поверхностный плазмонный резонанс.

ВВЕДЕНИЕ. Бактериальные LA (L-аспарагинамидогидролаза; КФ 3.5.1.1) используются в терапии опухолевых заболеваний крови и считаются одним из самых эффективных средств при лечении острого лимфобластного лейкоза [1].

Большинство бактериальных LA в активном состоянии представляют собой гомотетрамеры. Олигомеризация бактериальной LA играет ведущую роль в её каталитической активности, так как активные центры данного фермента формируются в области контакта между субъединицами [2]. При образовании димера LA происходит формирование двух активных центров в зоне контакта, однако расщеплять L-аспарагин они не способны, так как только тетрамер LA обладает ферментативной активностью [3-8]. Несмотря на широкий интерес, проявляемый на протяжении многих лет к LA, в литературе практически отсутствуют какие-либо данные о процессах, протекающих при её олигомеризации.

* - адресат для переписки

На сегодняшний день существует множество экспериментальных методов, с помощью которых можно исследовать белок-белковые взаимодействия при олигомеризации и сборке мультисубъединичных белков [9-12]. Существуют также биоинформационные подходы, позволяющие предсказывать белок-белковые взаимодействия, оценивать возможную устойчивость белковых комплексов, предсказывать возможные контактные участки в структурах белков и так далее. Совместное использование экспериментальных и биоинформационных подходов значительно повышает эффективность исследования белок-белковых взаимодействий, в том числе и олигомеризации мультисубъединичных белков.

Ранее нами было показано [13], что в стабилизацию олигомерного комплекса LA *Erwinia carotovora* наибольший вклад вносит электростатическое взаимодействие (типа “солевой мостик”) между субъединицами ферментного белка. Было сделано заключение о важной роли электростатической комплементарности между контактными областями в олигомерах, что должно приводить к крайне высокой специфичности молекулярного узнавания при олигомеризации фермента.

В данной работе мы исследовали специфичность молекулярного узнавания при олигомеризации ряда бактериальных LA с помощью биоинформационных методов и оптического биосенсора, работающего на эффекте поверхностного плазмонного резонанса. Было обнаружено, что устойчивые тетрамерные комплексы образуются только из субъединиц одного вида, что говорит о крайне высокой, практически абсолютной, специфичности молекулярного узнавания. На примере двух мутантных вариантов LA *Helicobacter pylori* было показано, что специфичность молекулярного узнавания заметно снижается при наличии даже одной точечной мутации в зоне контакта субъединиц высоко гомологичных близкородственных ферментов.

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

Препараты LA *H. pylori* J99 и *H. pylori* 26695 (чистота 90% по электрофорезу в 12% полиакриламидном геле с SDS) были получены в лаборатории медицинской биотехнологии ИБМХ РАМН (Москва, Россия).

Препараты LA *E. coli* и *Erw. chrysanthemi* были получены от фирм “Medac” (Германия) и “Sigma-Aldrich” (США), соответственно.

Биосенсорный анализ олигомеризации LA. Эксперименты были выполнены на оптическом биосенсоре Biacore 3000 (“GE Healthcare”), регистрирующем межмолекулярные взаимодействия с помощью эффекта поверхностного плазмонного резонанса [14, 15]. В работе были использованы стандартные оптические чипы CM5, покрытые карбоксилированным декстраном.

Иммобилизация LA на поверхности оптического чипа CM5. Иммобилизация LA осуществлялась ковалентно за первичные аминогруппы, расположенные на поверхности белка. Пример сенсограммы иммобилизации фермента показан на рисунке 1. Карбоксилированный декстран на поверхности чипа CM5 был активирован путем пропускания смеси 0,2 M EDC / 0,05 M NHS в течение 10 мин при скорости потока 1 мкл/мин с последующей промывкой HBS-буфером при той же скорости в течение 3 мин. Далее была выполнена иммобилизация LA путём пропускания раствора белка (5 мкг/мл) в иммобилизационном буфере (10 mM ацетатный буфер, pH 4,5) в течение 10 мин при скорости потока 1 мкл/мин. Далее не прореагировавшие активированные группы на поверхности чипа были блокированы пропусканием 1 M раствора этаноламина (pH 8,5) в течение 7 мин при скорости потока 1 мкл/мин с последующей промывкой рабочим HBS-буфером.

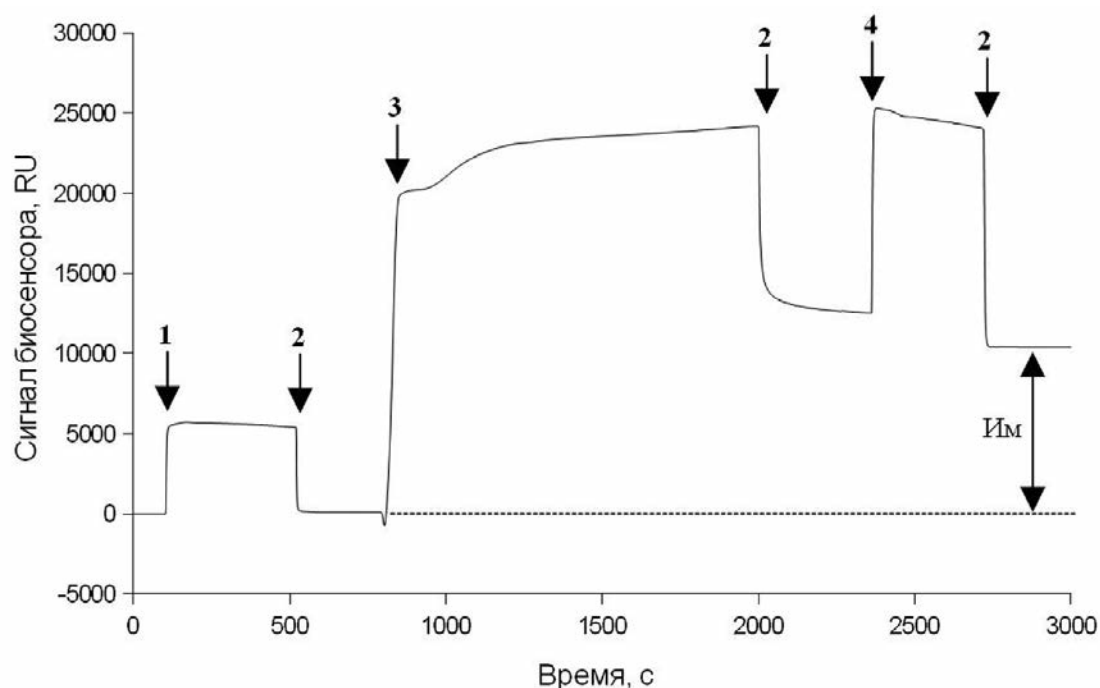


Рисунок 1.

Сенсограмма иммобилизации L-аспарагиназы на поверхности чипа CM5. Стрелками обозначены моменты начала пропускания следующих растворов: 1 - смесь 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 (примерно 10000 RU, что соответствует 10 нг белка).

После иммобилизации LA длительная промывка измерительной кюветы рабочим HBS-буфером приводила к постепенному снижению сигнала биосенсора, обусловленному медленной диссоциацией иммобилизованных тетрамеров белка. Ускорение диссоциации олигомеров иммобилизованной LA достигалось за счёт пропускания кислого буфера глицин-HCl (pH 2,5).

Эксперименты по изучению специфичности молекулярного узнавания при олигомеризации бактериальных LA. Для оценки специфичности молекулярного узнавания при олигомеризации бактериальных LA в 3 каналах оптического чипа были иммобилизованы LA *E. coli*, *H. pylori* J99 и *H. pylori* 26695. Иммобилизованные LA при пропускании кислого глицинового буфера (pH 2,5) диссоциировали на субъединицы и на поверхности оптического чипа оставались мономеры ферментов. Далее через все каналы оптического чипа пропускались растворы следующих LA в иммобилизационном буфере:

- LA *E. coli* (50 мкг/мл),
- LA *H. pylori* J99 (250 мкг/мл),
- LA *Erw. chrysanthemi* (50 мкг/мл),
- LA *H. pylori* 26695 (250 мкг/мл).

При этом в трёх каналах оптического биосенсора параллельно регистрировались процессы реконструкции нативных или химерных олигомерных форм ферментов.

Входные данные для молекулярного моделирования. Аминокислотные последовательности LA *H. pylori* J99 и *H. pylori* 26695 были взяты из базы данных на протеомном сервере ExPASy [4, 16, 17] (коды Q9ZLB9 и O25424, соответственно). Трёхмерные координаты кристаллических структур и аминокислотные последовательности LA из разных источников (*E. coli*, *Wolinella succinogenes*, *Pseudomonas* 7A, *Erw. chrysanthemi*, *Erw. carotovora*) были взяты из соответствующих файлов белкового банка данных Protein Data Bank (PDB) [18] (PDB индексы: 3ECA [19], 1WSA [20], 4PGA [21], 1O7J [7] и 1ZCF [22], соответственно).

Использованное программное обеспечение. Сигнальный участок в каждой из аминокислотных последовательностей бактериальных LA был определен с помощью программы SignalP 3.0 Server [25]. Для этого в программу была загружена каждая из последовательностей в формате FASTA. Все параметры были приняты по умолчанию. Рассчитанные программой данные были представлены в виде диаграммы, отражающей вероятность, по какому аминокислотному остатку может протекать посттрансляционное отщепление сигнального пептида. Для дальнейшей работы с последовательностью сигнальный участок был удалён.

Множественное выравнивание последовательностей LA из разных источников (*Erw. carotovora*, *Erw. chrysanthemi*, *W. succinogenes*, *Pseudomonas* 7A, *E. coli*, *H. pylori* J99 и *H. pylori* 26695) было выполнено с помощью программы ClustalW 1.83 [26].

С целью определения аминокислотных остатков, образующих интерфейс между субъединицами в димере AC LA, и выявления среди них значимых для олигомеризации белка был выполнен анализ зоны контакта между мономерами с помощью виртуального аланинового сканирования на сервере Robetta [27]. Для этого программа поочерёдно заменяет каждый аминокислотный остаток на аланин и рассчитывает изменение энергии взаимодействия между субъединицами в результате такой замены. Все расчёты были выполнены по уравнению, приведённому в общем виде [27]:

$$\Delta\Delta E = (E_{A/B} - E_A - E_B) - (E'_{A/B} - E'_A - E'_B) \quad (1),$$

где: $\Delta\Delta E$ – изменение энергии связывания между партнёрами белок-белкового взаимодействия до и после замены; $E_{A/B}$ – свободная энергия комплекса A/B дикого типа; E_A – свободная энергия белка-партнера A дикого типа; E_B – свободная энергия белка-партнера B дикого типа; $E'_{A/B}$ – свободная энергия комплекса мутантного типа; E'_A – свободная энергия белка-партнера A мутантного типа; E'_B – свободная энергия белка-партнера B мутантного типа.

Следующие процедуры были выполнены с помощью программного пакета Sybyl 6.9.1 (Tripos Inc.) на сервере SGI Origin200 с использованием поля сил Tripos и расчетом зарядов по методу Gasteiger-Huckel [28]:

1) Моделирование трёхмерных структур LA *H. pylori* J99 и *H. pylori* 26695.

Аминокислотные последовательности, отобранные с помощью программы ClustalW 1.83 [21] и подготовленные в программе SignalP 3.0 Server [20] были использованы в программе Composer для моделирования трёхмерных структур LA *H. pylori* J99 и *H. pylori* 26695 по гомологии. Данная процедура более детально описана в более ранней работе для LA *Erw. carotovora* [13]. Полученная структура мономера была оптимизирована путем минимизации свободной энергии. Модель тетрамера данного фермента была получена путем замещения структур мономеров в исходном тетрамере LA *E. coli*.

2) Оптимизация молекулярных моделей и моделирование молекулярной динамики структуры LA. Минимизация энергии моделей LA была выполнена по методу Powell с максимальным числом итераций 600 [29]. Моделирование молекулярной динамики LA было выполнено в вакууме при постоянной температуре 300°K с продолжительностью 20 пс и шагом 1 фс.

3) Оценка энергии межсубъединичного взаимодействия.

Энергию взаимодействия между мономерами и димерами вычисляли по формуле:

$$\Delta E = E_{AB} - (E_A + E_B) \quad (2),$$

где: ΔE – энергии взаимодействия партнера А с партнером В; E_{AB} – энергия комплекса; E_A – энергия партнера А; E_B – энергия партнера В.

4) Моделирование химерных тетрамерных комплексов LA.

5) Определение мест возможного образования солевых мостиков между субъединицами в диких и химерных LA путем построения карт распределения зарядов на поверхности каждой субъединицы. Для каждого заряженного значимого остатка был выполнен поиск противоположно заряженного значимого остатка на поверхности другой субъединицы. Предположительно, такая ионная пара образует солевой мостик, вносящий вклад в устойчивость белок-белкового комплекса.

Модели химерных тетрамерных комплексов были получены путём замены субъединицы А на соответствующую субъединицу LA другого вида. Валидация полученных моделей была выполнена с помощью программы PROCHECK 3.4.4 [30] и сравнительного анализа структур LA с помощью программы LGA (Local-Global Alignment v.03/2003) на сайте Protein Structure Prediction Center [31]. Программа LGA выполняет сравнительный анализ между моделью и образцом. Важной характеристикой качества структуры в программе является оценка LGA_Q. Модели, для которых LGA_Q < 2, принято считать недостоверными [31].

С помощью программ LEaP и SANDER, входящих в программный пакет Amber 7 [32], с использованием поля сил Amber выполнялась оптимизация моделей химерных тетрамеров LA. Для этого в программе LEaP [32] для всех оптимизируемых структур подготавливались файлы координат и топологии (последний содержит информацию о типах атомов, их названиях, названиях остатков, зарядах и др.). Далее в программе SANDER [32] для химерных тетрамеров выполнялись минимизация энергии и моделирование молекулярной динамики в водном боксе при постоянном объеме и температуре 300°K с продолжительностью 200 пс и шагом 0,5 пс.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Построение трехмерных моделей LA *H. pylori* J99 и *H. pylori* 26695 и их оптимизация. Возможную специфичность молекулярного узнавания при олигомеризации бактериальных LA оценивали путем сравнения энергии взаимодействия субъединиц в нативных и химерных тетрамерных комплексах из субъединиц LA разных видов.

Так как кристаллографические данные о структуре LA *H. pylori* отсутствовали, то нами были построены модели пространственных структур для LA *H. pylori* 26695 и *H. pylori* J99 (на момент написания данной статьи в декабре 2009 г. в PDB появилась структура LA *H. pylori*, код PDB 2WLT).

Аминокислотные последовательности, определяющие структуру мономеров LA *H. pylori* 26695 и *H. pylori* J99, были предварительно проанализированы с помощью программы SignalP 3.0 Server и первый аминокислотный остаток (Met1) был определен как сигнальный фрагмент. Поскольку в нативном белке он отсутствует, то в дальнейшей работе он был удалён из этих последовательностей.

С помощью программы ClustalW 1.83 был выполнен поиск ближайших гомологов для LA *H. pylori* J99 и *H. pylori* 26695. В результате были получены оценки гомологии последовательностей LA *H. pylori* 26695 и *H. pylori* J99 и LA из других источников (табл. 1). Наибольшая гомология наблюдается между LA *H. pylori* 26695, *H. pylori* J99, *E. coli* и *W. succinogenes*. Моделирование при гомологии менее 50% чревато существенными ошибками в структуре модели, особенно в области петли.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ L-АСПАРАГИНАЗ

Таблица 1. Оценка гомологии последовательностей L-аспарагиназ *H. pylori* 26695 и *H. pylori* J99 и L-аспарагиназ из других источников.

Последовательность А	Последовательность Б	Оценка гомологии, %
L-аспарагиназа <i>H. pylori</i> 26695	L-аспарагиназа <i>Erw. chrysanthemi</i>	45
L-аспарагиназа <i>H. pylori</i> 26695	L-аспарагиназа <i>Erw. carotovora</i>	46
L-аспарагиназа <i>H. pylori</i> 26695	L-аспарагиназа <i>E. coli</i>	49
L-аспарагиназа <i>H. pylori</i> 26695	L-аспарагиназа <i>W. succinogenes</i>	52
L-аспарагиназа <i>H. pylori</i> 26695	L-аспарагиназа <i>Pseudomonas TA</i>	43
L-аспарагиназа <i>H. pylori</i> J99	L-аспарагиназа <i>Erw. chrysanthemi</i>	45
L-аспарагиназа <i>H. pylori</i> J99	L-аспарагиназа <i>Erw. carotovora</i>	46
L-аспарагиназа <i>H. pylori</i> J99	L-аспарагиназа <i>E. coli</i>	50
L-аспарагиназа <i>H. pylori</i> J99	L-аспарагиназа <i>W. succinogenes</i>	52
L-аспарагиназа <i>H. pylori</i> J99	L-аспарагиназа <i>Pseudomonas TA</i>	42

Примечание. Оценка гомологии была получена программой ClustalW 1.83. Все параметры программы приняты по умолчанию.

Моделирование трёхмерных структур было выполнено с помощью программы COMPOSER из программного комплекса Sybyl [28]. Для LA *H. pylori* 26695, *E. coli* и *W. succinogenes* были определены наиболее гомологичные участки. Для фрагментов последовательности с низкой гомологией был выполнен поиск гомологичных структур в базе данных Sybyl. Далее программой COMPOSER была построена пространственная структура мономера LA *H. pylori* 26695. Модель тетрамера была получена путём замещения мономеров в структуре LA *E. coli* (PDB индекс 3ECA [19]) на четыре копии мономера LA *H. pylori* 26695. Таким же образом была получена модель тетрамера LA *H. pylori* J99.

Для полученных моделей тетрамеров LA *H. pylori* 26695 и *H. pylori* J99 были выполнены процедуры минимизации энергии и моделирования молекулярной динамики в программном комплексе Sybyl с целью оптимизации трёхмерной структуры тетрамеров. Оптимизированные модели тетрамеров LA *H. pylori* 26695 и *H. pylori* J99 представлены на рисунке 2.

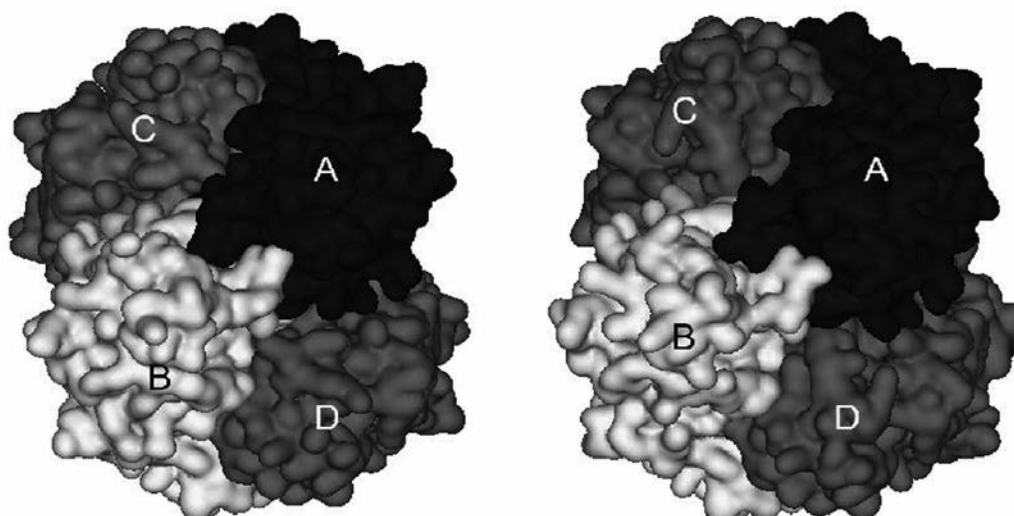


Рисунок 2.

Модели тетрамеров L-аспарагиназ *H. pylori* 26695 (слева) и *H. pylori* J99 (справа). Субъединицы окрашены в разные оттенки серого.

Проверка качества полученных моделей LA *H. pylori* 26695 и *H. pylori* J99 была выполнена путем построения и анализа карт Рамачандрана (рис. 3) в программе ProCheck и с помощью сравнительного анализа в программе LGA (табл. 2) [31]. Результаты программы ProCheck представлены в таблице 3. Карты Рамачандрана были построены для каждой субъединицы гомотетрамера. Поскольку карты всех субъединиц идентичны, то на рисунке 3 приведены только карты Рамачандрана для субъединицы А каждой анализируемой LA. На картах для LA *E. coli*, *H. pylori* 26695 и *H. pylori* J99 значения углов почти всех аминокислотных остатков находятся в допустимых зонах (99,7%, 98,6% и 99%, соответственно), что говорит о приемлемом качестве моделей. Полученные в программе LGA оценки качества (LGA_Q) 92,887 и 96,233 для моделей LA *H. pylori* 26695 и *H. pylori* J99, соответственно, говорят в пользу хорошего качества моделей.

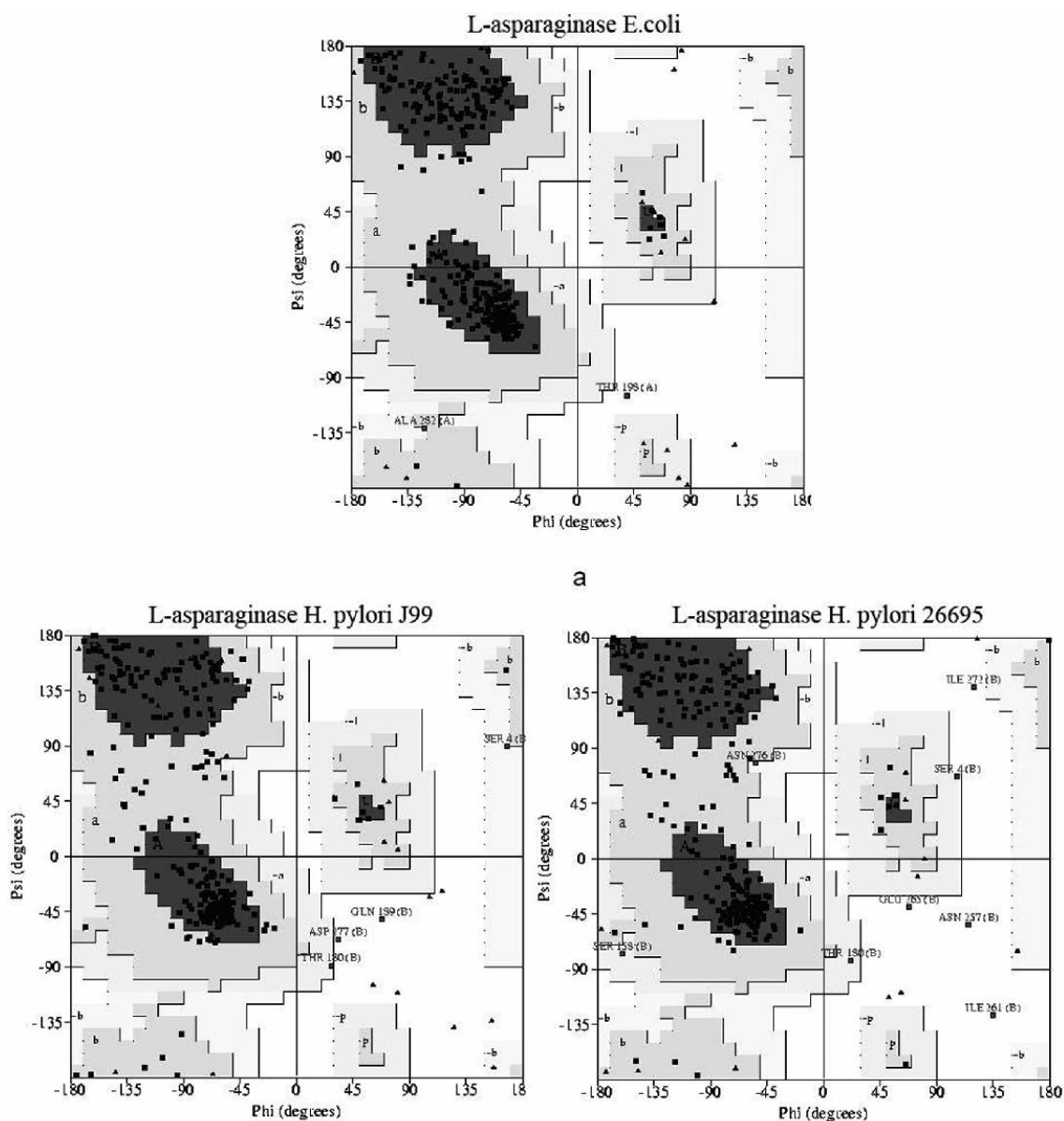


Рисунок 3.

Карты Рамачандрана для L-аспарагиназ *E. coli* (а), *H. pylori* 26695 (б) и *H. pylori* J99 (в). Карты разделены на четыре основные зоны: предпочитаемая (темно-серая), разрешённая (серая), допустимая (светло-серая) и запрещённая (белая).

СПЕЦИФИЧНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ L-АСПАРАГИНАЗ

Таблица 2. Сравнительный анализ структур L-аспарагиназ *H. pylori* 26695 и *H. pylori* J99 с L-аспарагиназой *E. coli*.

Модели	N	RMSD	LGA_Q
L-аспарагиназа <i>H. pylori</i> 26695	1176	1,17	92,887
L-аспарагиназа <i>H. pylori</i> J99	1184	1,13	96,233

Примечание. Сравнительный анализ был выполнен с использованием программы LGA. Все параметры программы приняты по умолчанию. N - количество совпадающих аминокислот; RMSD - среднеквадратичное отклонение, рассчитанное для совпадающих аминокислот; LGA_Q - качественная оценка, рассчитанная по формуле: $Q=0,1 \cdot N/(0,1+RMSD)$.

Таблица 3. Процентная доля аминокислотных остатков L-аспарагиназ *H. pylori* 26695 и *H. pylori* J99, расположенных в одной из четырёх зон карты Рамачандрана.

Зоны карты Рамачандрана	Предпочитаемая	Разрешённая	Допустимая	Запрещённая
Ферменты				
L-аспарагиназа <i>H. pylori</i> 26695	77,8%	19,1%	1,7%	1,4%
L-аспарагиназа <i>H. pylori</i> J99	76,7%	20,5%	1,7%	1,0%

Построение трёхмерной модели химерных тетрамеров LA и их оптимизация. Для проверки специфичности молекулярного узнавания при олигомеризации бактериальных LA были построены модели химерных комплексов, состоящих из субъединиц от разных LA (в скобках указаны буквенные обозначения субъединиц):

- *E. coli* (A) – *Erw. chrysanthemi* (BCD)
- *E. coli* (A) – *H. pylori* J99 (BCD)
- *E. coli* (A) – *H. pylori* 26695 (BCD)
- *H. pylori* J99 (A) – *E. coli* (BCD)
- *H. pylori* J99 (A) – *H. pylori* 26695 (BCD)
- *H. pylori* 26695 (A) – *E. coli* (BCD)
- *H. pylori* 26695 (A) – *H. pylori* J99 (BCD)

Для оценки устойчивости химерных комплексов был выполнен анализ интерфейса между субъединицами A и C, поскольку тетрамер бактериальных LA представляет собой “димер димеров” и активные центры белка образуются в димерах AC и BD [2, 24, 33]. Заметное снижение энергии взаимодействия субъединиц A и C в химерном димере будет с высокой вероятностью говорить о нестабильности химерного тетрамера.

Значения общей энергии взаимодействия между мономерами A и C в химерных тетрамерах были рассчитаны по уравнению 2 с использованием программного комплекса Sybyl (рис. 4). Из рисунка видно, что химерный комплекс *H. pylori* J99 (A) – *H. pylori* 26695 (BCD) близок по значению энергии к своим диким аналогам, из чего можно заключить, что между субъединицами LA *H. pylori* J99 и *H. pylori* 26695 возможно взаимодействие.

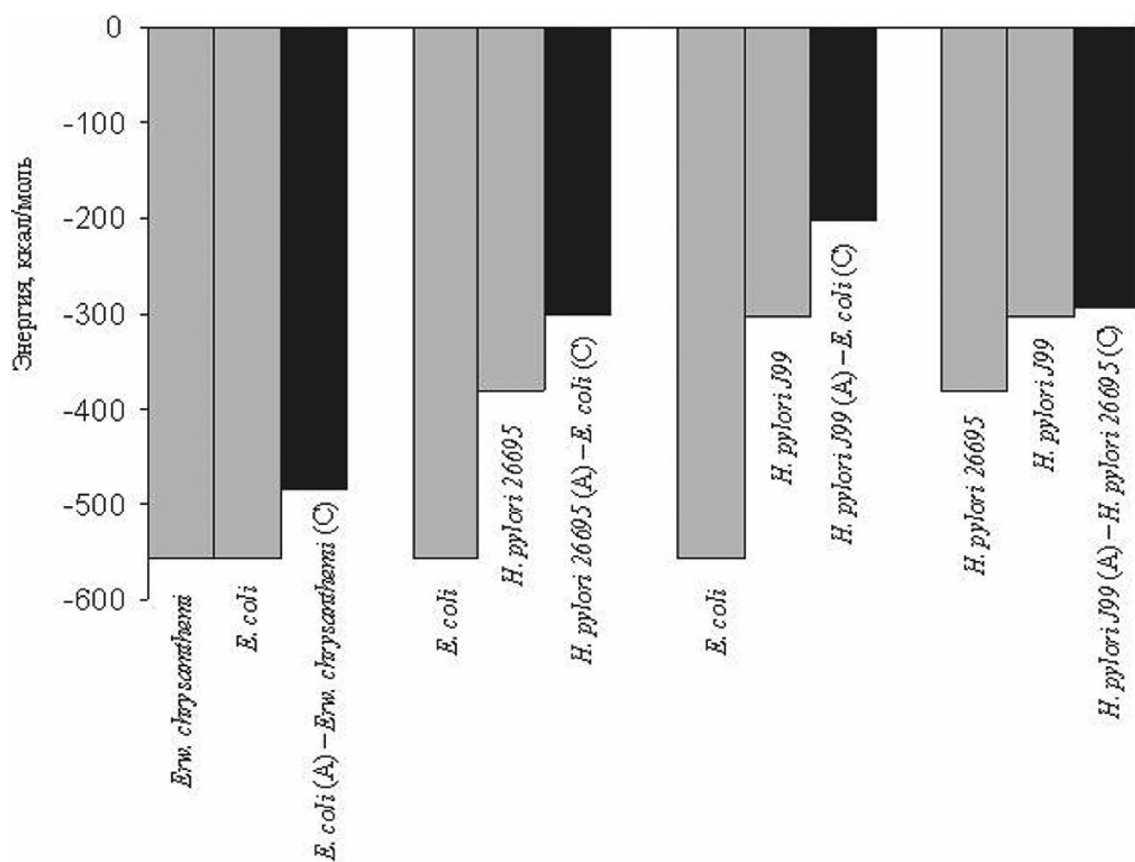


Рисунок 4.

Оценка значений энергии взаимодействия между субъединицами в димере AC в химерных тетрамерах L-аспарагиназы (черные столбцы) и в их диких формах (серые столбцы).

Определение аминокислотных остатков, образующих интерфейс между субъединицами A и C в химерных димерах LA и их диких формах. Для оценки вклада различных аминокислот, формирующих область контакта между мономерами A и C в вариантах химерных и диких форм димеров LA, было выполнено виртуальное аланиновое сканирование данного интерфейса. В ходе анализа были определены аминокислотные остатки, формирующие интерфейс между мономерами A и C, и те из них, которые вносят значимый вклад в энергию образования димера AC (аминокислотные остатки, замена которых на аланин приводит к изменению свободной энергии комплекса больше 1 ккал/моль [27]). Полученные результаты представлены в таблицах 4 и 5. Из этих данных следует, что при образовании химерного димера AC из субъединиц разных LA происходит уменьшение общего числа значимых аминокислотных остатков в интерфейсе между мономерами A и C по сравнению с дикой формой LA. Также в химерных комплексах снижается количество солевых мостиков в интерфейсе между субъединицами A и C (табл. 6). Уменьшение количества солевых мостиков вероятней всего будет приводить к снижению стабильности химерных димеров. Образование солевых мостиков в интерфейсе между мономерами A и C возможно только при наличии электростатической комплементарности между этими субъединицами. Следовательно, даже небольшие смещения в расположении аминокислотных остатков интерфейса, участвующих в образовании солевых мостиков, могут приводить к снижению общей устойчивости всего тетрамера LA.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ L-АСПАРАГИНАЗ

Электростатическая комплементарность - один из факторов, определяющих высокую специфичность молекулярного узнавания при олигомеризации бактериальных LA и контролирующих правильное формирование активного центра, расположенного в зоне контакта между субъединицами.

Таблица 4. Влияние аланиновой замены на стабильность димера AC в диких L-аспарагиназах.

а/о	ΔE_{AC} ккал/ моль	а/о	ΔE_{AC} ккал/ моль	а/о	ΔE_{AC} ккал/ моль	а/о	ΔE_{AC} ккал/ моль	а/о	ΔE_{AC} ккал/ моль	а/о	ΔE_{AC} ккал/ моль
L-аспарагиназы <i>Erw. chrysanthemi</i>				L-аспарагиназы <i>E. coli</i>				L-аспарагиназы <i>H. pylori</i> 26695			
A		C		A		C		A		C	
E63	1,06	S62	1,15	Y25	1,1	Q59	1,59	Q63	2,68	Q63	2,82
N64	1,36	E63	1,07	D63	1,91	N62	1	E67	5,47	D64	1,16
D96	2,76	N64	1,24	E94	1,97	D90	1,63	E100	1,86	T95	2,35
T97	1,24	T95	2,6	T165	2,14	T91	1,47	K168	3,17	K168	2,83
E99	1,37	D96	1,85	I216	1,25	E93	1,38	H170	2,49	H170	1,4
E100	3,95	T97	2,62	Y218	3,23	E94	2,04	T171	2,57	T171	2,43
S101	3,43	E100	3,93	Y220	2,54	K162	2,18	Y225	3,54	Y225	3,58
K168	2,34	S101	3,53	N222	1,18	I216	1,25	H227	1,43	H227	1,45
D221	4,46	K168	2,65	S224	1,15	Y218	5,18	L234	1,77	L234	1,76
I222	1,42	I222	1,35	L226	1,1	Y220	2,29	R279	1,15	S241	1,04
Y224	2,48	Y224	2,53	Y236	1,27	N222	1,65	V280	1,16	R279	2,25
Y226	3,04	Y226	5,63	N248	1,41	S224	1,41	S282	1,21	V280	1,22
Q227	6,7	Q227	6,21	Y250	1,24	L231	1,08	Q304	2,76	S282	2,61
D228	1,52	D228	1,51	R272	3,05	Y250	1,3	R307	5,28	Q304	2,74
Y232	1,38	Y232	2,14	V273	1,04	R272	2,58			R307	2,28
L233	1,7	L233	1,05	Q300	2,21	V273	1,12				
T277	2,25	T277	2,23	R303	2,67	Q300	1,6				
R278	3,85	R278	4,96			R303	1,88				
T279	3,29	T279	2,74								
R304	1,7	R304	1,67								

Примечание. Аланиновое сканирование было выполнено на сервере Robetta [27]. а/о - заменяемая аминокислота; ΔE_{AC} - изменение энергии образования димера AC в результате замены. В таблице приведены данные по значимым аминокислотным остаткам во взаимодействии между мономерами A и C.

Таблица 5. Влияние аланиновой замены на стабильность химерного димера АС.

а/о	ΔE_{AC} ккал/ моль	а/о	ΔE_{AC} ккал/ моль	а/о	ΔE_{AC} ккал/ моль	а/о	ΔE_{AC} ккал/ моль	а/о	ΔE_{AC} ккал/ моль	а/о	ΔE_{AC} ккал/ моль
<i>E. coli</i> (A)		<i>Erw. chrysanthemi</i> (C)		<i>E. coli</i> (A)		<i>H. pylori</i> 26695 (C)		<i>H. pylori</i> J99 (A)		<i>H. pylori</i> 26695 (C)	
N24	1,04	E63	1,36	D60	2,39	K220	1,23	Y28	1,7	Q63	1,36
Q59	1,03	D96	3,65	D90	1,77	Y225	3,35	D95	1,65	K168	1,1
D63	7,71	E99	1,68	T91	1,12	H227	2,5	T96	1,1	T171	2,36
W66	1,04	E100	3,9	E94	2	L234	2,37	E98	5,56	D222	1,07
T91	1,13	K168	1,23	K162	1,78	S241	1,03	E99	5,16	Y225	4,83
E94	1,88	I222	1,1	T163	1,99	N253	3,77	N122	2,03	H227	1,62
K162	1,31	Y224	7,12	N164	8,79	N255	1,98	H169	1,99	T231	1,08
T165	2,31	Y226	2,05	T165	2,45	S278	1,47	T170	1,79	L234	1,66
I216	1,15	Q227	3,47	I216	1,42	R279	1,66	T171	2,83	S241	1,37
Y218	2,57	D228	1	Y220	4,17	V280	1,29	Y224	2,79	N255	1,46
Y220	1,64	D229	1,4	N222	1,43	S287	1,73	H226	2	R279	6,98
N222	1,93	Y232	2,15	D225	1,04	Q304	1,99	T230	1,22	E289	1,26
L226	1,11	L233	1,57	L226	1			L233	1,26	Q304	3,67
N248	1,65	R258	1,46	R272	1,78			R278	2,33		
R272	5,02	R278	2,08	T275	1,17			Q305	5,56		
Q300	5,05			N298	1,3						
R303	6,54										

Примечание. Аланиновое сканирование было выполнено на сервере Robetta [27]. а/о - заменяемая аминокислота; ΔE_{AC} - изменение энергии образования димера АС в результате замены. В таблице приведены данные по значимым аминокислотным остаткам во взаимодействии между мономерами А и С.

Таблица 6. Число возможных солевых мостиков в зоне контакта между мономерами А и С в химерных и диких димерах L-аспарагиназ.

L-аспарагиназа <i>E. coli</i>	6	<i>E. coli</i> (A) – <i>Erw. chrysanthemi</i> (BCD)	4
L-аспарагиназа <i>Erw. chrysanthemi</i>	10	<i>E. coli</i> (A) – <i>H. pylori</i> 26695 (BCD)	4
L-аспарагиназа <i>H. pylori</i> 26695	6	<i>H. pylori</i> J99 (A) – <i>H. pylori</i> 26695 (BCD)	6

Примечание. Данные получены с помощью программы Sybyl 6.9.1.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ L-АСПАРАГИНАЗ

Экспериментальная оценка специфичности молекулярного узнавания при олигомеризации бактериальных LA. Оценка специфичности молекулярного узнавания при олигомеризации осуществлялась путем регистрации процессов реконструкции нативных или химерных олигомерных форм ферментов параллельно в трёх каналах оптического биосенсора.

В случае LA *E. coli* наблюдалась олигомеризация только дикой формы при пропускании раствора самой LA *E. coli* (рис. 5).

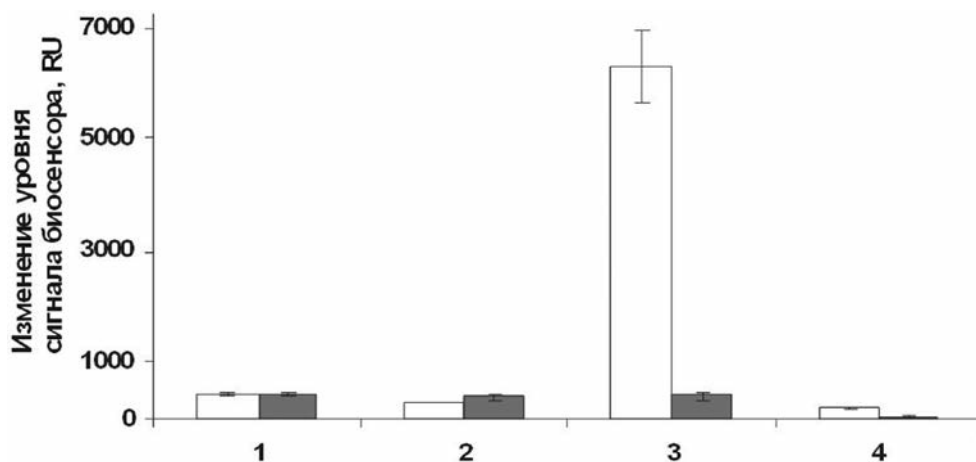


Рисунок 5.

Регистрация связывания L-аспарагиназ из пропускаемых растворов на поверхности чипа в кювете с иммобилизованной L-аспарагиназой *E. coli*. Столбцы контроля (связывание в канале с карбоксиметилированным декстраном) окрашены в серый цвет. Номерами обозначены: L-аспарагиназы: *H. pylori* J99 (1), *H. pylori* 26695 (2), *E. coli* (3), *Erw. chrysanthemi* (4).

В случае LA *H. pylori* J99 наблюдалась олигомеризация при пропускании растворов LA *H. pylori* J99 (формирование олигомеров дикой формы) и *H. pylori* 26695 (формирование химерных олигомеров) (рис. 6). Это легко объяснимо, так как гомология первичных структур этих белков достигает 93% и область контактного интерфейса, обеспечивающая узнавание субъединиц при олигомеризации достаточно консервативна (рис. 7). Тем не менее, возрастание уровня сигнала оптического биосенсора при образовании химерного комплекса LA *H. pylori* J99 (A) - *H. pylori* 26695 (BCD) значительно ниже, что говорит о заметном влиянии даже одной точечной мутации в области контакта субъединиц близкородственных LA.

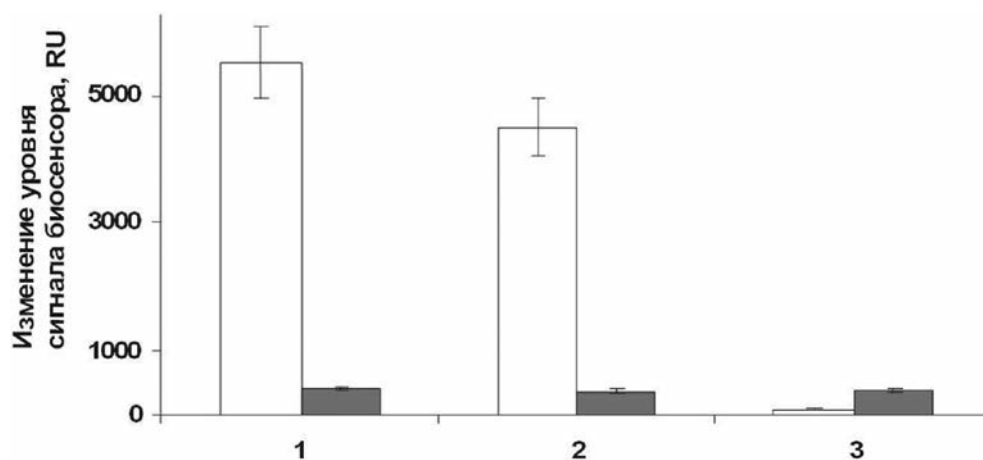


Рисунок 6.

Регистрация связывания L-аспарагиназ из пропускаемых растворов на поверхности чипа в кювете с иммобилизованной L-аспарагиназой *H. pylori* J99. Столбцы контроля (связывание в канале с карбоксиметилированным декстраном) окрашены в серый цвет. Номерами обозначены L-аспарагиназы: *H. pylori* J99 (1), *H. pylori* 26695 (2), *E. coli* (3).

Парное выравнивание аминокислотных последовательностей L-аспарагиназ *H. pylori* 26695 и *H. pylori* J99. Выделенные аминокислотные остатки находятся в области интерфейса между мономером А и тримером BCD в тетрамерах обоих L-аспарагиназ и являются значимыми в межузбедничном взаимодействии. Выравнивание выполнено с помощью программы ClustalW 1.83. Все параметры программы приняты по умолчанию.

Условие	Положительное изменение (RU)	Отрицательное изменение (RU)
1	~4000	~400
2	~6000	~400
3	~100	~400

Регистрация связывания L-аспарагиназы из пропускаемых растворов на поверхности чипа в кювете с иммобилизованной L-аспарагиназой *H. pylori* 26695. Столбцы контроля (связывание в канале с карбоксиметилированным декстраном) окрашены в серый цвет. Номерами обозначены L-аспарагиназы: *H. pylori* J99 (1), *H. pylori* 26695 (2), *E. coli* (3).

62

Устойчивые тетрамерные комплексы образуются только из субъединиц одного вида. Взаимодействие между субъединицами разных LA не приводит к образованию устойчивых комплексов. На примере двух мутантных вариантов LA *Helicobacter pylori* было показано, что специфичность молекулярного узнавания заметно снижается при наличии даже одной точечной мутации в зоне контакта высоко гомологичных близкородственных субъединиц.

Работа была выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант 11-04-01965-а) и Министерства образования и науки (госконтракт №02.740.11.0306).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Pinheiro J.P., Boos J.* (2004) Br.J.Haematol., **125**(2), 117-127.
2. *Aghaiypour K., Wlodawer A., Lubkowski J.* (2001) Biochemistry, **40**, 5655-5664.
3. *Ehrman M., Cedar H., Schwartz J.H.* (1971) J.Biol.Chem., **246**, 88-94.
4. *Kotzia G.A., Labrou N.E.* (2005) J. Biotechnol., **119**, 309-323.
5. *Kozak M., Jaskolski M., Rohm K.H.* (2000) Acta Biochim. Pol., **47**, 807-814.
6. *Krasotkina J., Borisova A.A., Gervaziev Y.V., Sokolov N.N.* (2004) Biotechnol. Appl. Biochem., **39**(Pt 2), 215-221.
7. *Lubkowski J., Dauter M., Aghaiypour K., Wlodawer A., Dauter Z.* (2003) Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., **59**(Pt 1), 84-92.
8. *Marlborough D.I., Miller D.S., Cammack K.A.* (1975) Biochim. Biophys. Acta, **386**, 576-589.
9. *Asthaigiri D., Paliwal A., Abras D., Lenhoff A.M., Paulaitis M.E.* (2005) Biophys. J., **88**, 3300-3309.
10. *Balbo A., Minor K.H., Velikovsky C.A., Mariuzza R.A., Peterson C.B., Schuck P.* (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102**, 81-86.
11. *Torreri P., Ceccarini M., Macioce P., Petrucci T.C.* (2005) Ann. Ist. Super. Sanita, **41**, 437-441.
12. *Pierce M.M., Raman C.S., Nall B.T.* (1999) Methods, **19**, 213-221.
13. *Мезенцев Ю.В., Мольнар А.А., Гнеденко О.В., Красоткина Ю.В., Соколов Н.Н., Иванов А.С.* (2006) Биомед. химия, **52**, 258-271.
14. *Myszka D.G.* (1997) Curr. Opin. Biotechnol., **8**, 50-57.
15. *Jonsson U., Fagerstam L., Ivarsson B., Johnsson B., Karlsson R., Lundh K., Lofas S., Persson B., Roos H., Ronnberg I.* (1991) Biotechniques, **11**, 620-627.
16. *Bell K.S., Sebahia M., Pritchard L., Holden M.T., Hyman L.J., Holeva M.C., Thomson N.R., Bentley S.D., Churcher L.J., Mungall K., Atkin R., Bason N., Brooks K., Chillingworth T., Clark K., Doggett J., Fraser A., Hance Z., Hauser H., Jagels K., Moule S., Norbertczak H., Ormond D., Price C., Quail M.A., Sanders M., Walker D., Whitehead S., Salmond G.P., Birch P.R., Parkhill J., Toth I.K.* (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**, 11105-11110.
17. *Apweiler R., Bairoch A., Wu C.H.* (2004) Curr. Opin. Chem. Biol., **8**, 76-80.
18. *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.
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) Biochemistry, **36**, 923-931.
22. *Кислицын Ю.А., Кравченко О.В., Никонов С.В., Куранова И.П.* (2006) Кристаллография, **51**, 811-816.
23. *Aghaiypour K., Wlodawer A., Lubkowski J.* (2001) Biochemistry, **40**, 5655-5664.

24. Jaskolski M., Kozak M., Lubkowski J., Palm G., Wlodawer A. (2001) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **57**(Pt 3), 369-377.
25. Bendtsen J.D., Nielsen H., von Heijne G., Brunak S. (2004) *J. Mol. Biol.*, **340**, 783-795.
26. 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*, **2004**(219), 12.
28. Sybyl 6.9, Tripos Inc., 1699 South Hanley Road, St Louis, Missouri, 63144, USA
29. Powell M.J.D. (1977) *Math. Programming*, **12**, 241-254.
30. Laskowski R.A., Macarthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M. (1993) *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-291.
31. Zemla A. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3370-3374.
32. Case D.A., Darden T.A., Cheatham T.E. III, Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Merz K.M., Wang B., Pearlman D.A., Crowley M., Brozell S., Tsui V., Gohlke H., Mongan J., Hornak V., Cui G., Beroza P., Schafmeister C., Caldwell J.W., Ross W.S., Kollman P.A. (2004) *AMBER 8*, University of California San Francisco.
33. Miller M., Mohana Rao J.K., Wlodawer A., Gribskov M.R. (1993) *FEBS Lett.*, **328**, 275-279.

Поступила: 16. 02. 2010.

SPECIFICITY OF MOLECULAR RECOGNITION IN OLIGOMERIZATION OF BACTERIAL L-ASPARAGINASES

Yu.V. Mezentsev¹, A.A. Molnar¹, N.N. Sokolov¹, V.B. Lisitsina², A.S. Ivanov¹, A.I. Archakov¹

¹Russian Academy of Medical Science, Institute of Biomedical Chemistry, RAMS, ul. Pogodinskaya, 10, Moscow, 119121 Russia; fax: 7 (499) 246-7115; e-mail: yuri.mezentsev@ibmc.msk.ru

²Russian State Medical University, ul. Ostrovitjanova str. 1, Moscow, 117997 Russia

Bacterial L-asparaginases, which are widely used in the antitumor therapy, act only as homotetramers, because their active sites are located at the interface between the subunits of the enzyme. Since salt bridges substantially stabilize L-asparaginase tetramers, we have supposed that oligomerization of bacterial L-asparaginase is a high-avidity process. This assumption was proved by bioinformatic and biosensoric methods. It was shown, that a stable tetrameric complex can be formed only by the subunits of the same L-asparaginase. Using two mutants of L-asparaginase *Helicobacter pylori* it was shown that specificity of molecular recognition is significantly reduced even by single point mutation at the interface of high-homologous closely-related subunits.

Key words: specificity, molecular recognition, oligomerization, L-asparaginase, computer modeling, optical biosensor, surface plasmon resonance.