

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ

УДК 538.911

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ РЕНТГЕНОВСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАНТНОЙ ФОРМЫ
L-АСПАРАГИНАЗЫ *Wolinella succinogenes*

© 2019 г. В. И. Тимофеев^{1,2}, Н. В. Булушова³, Н. Е. Жухлистова¹, И. П. Куранова^{1,2,*}

¹ Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

² Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

³ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, Россия

* E-mail: inna@crys.ras.ru

Поступила в редакцию 04.03.2019 г.

После доработки 04.03.2019 г.

Принята к публикации 19.03.2019 г.

Мутантная форма L-аспарагиназы *Wolinella succinogenes* (Was72), содержащая две замены V23Q и K24T в C-концевом участке N-концевой петли, ограничивающей активный центр и имеющая глутаминазную активность, в 8 раз меньшую по сравнению с исходной формой, закристаллизована в апо-форме и в комплексах с L-аспарагиновой и L-глутаминовой кислотами. Кристаллы апо-формы фермента получены в двух модификациях (пр. гр. $P2_1$ и $P22_12_1$). Кристаллы, выращенные в присутствии аспарагиновой или глутаминовой кислоты, имеют одну и ту же пр. гр. $P2_1$, но разные параметры элементарной ячейки. Для всех типов кристаллов собраны дифракционные наборы при разрешении 1.65–2.00 Å. Все наборы пригодны для решения пространственной структуры фермента.

DOI: 10.1134/S0023476119060225

ВВЕДЕНИЕ

Ферменты семейства аспарагиназ, широко распространенные среди микроорганизмов, относятся к треонинамидогидролазам (ЕС 3.5.1.1) и катализируют гидролиз аспарагина до аспарагиновой кислоты и аммиака. Замечательной особенностью L-аспарагиназ является их ярко выраженная противоопухолевая активность, благодаря которой они находят применение в медицине как эффективные антиопухолевые агенты при лечении острых лимфобластных лейкозов, лимфо- и ретикулосарком [1–3]. Антиопухолевую активность L-аспарагиназ связывают с их способностью подавлять метаболизм аспарагина, необходимого для роста раковых клеток [2]. Однако антиопухолевая активность аспарагиназ сопровождается рядом побочных эффектов из-за токсичности, которая частично ассоциируется с глутаминазной активностью ферментов. Поскольку L-глутамин важен для транспорта азота в крови, то длительное уменьшение его концентрации, возникающее при терапии аспарагиназами, вызывает серьезные расстройства в организме. В результате только некоторые аспарагиназы, например из *Erwinia chrysanthemi*, *Wolinella succinogenes* [4–6], имеющие наиболее низкую глутаминазную активность, можно использовать в качестве лекарств.

Поиск и инженерия новых аспарагиназ, эффективных в качестве терапевтических агентов, остаются актуальными, и различные представители этого класса ферментов интенсивно изучаются [4–10]. Особый интерес представляет изучение факторов, влияющих на изменение соотношения аспарагиназной и глутаминазной активности аспарагиназ. Низкая глутаминазная активность благоприятствует применению аспарагиназ в медицине, а выяснение причин, обуславливающих избирательность ферментов по отношению к субстратам (аспарагину и глутамину), представляет значительный теоретический интерес.

Пространственные структуры ряда аспарагиназ установлены не только для свободных ферментов, но и для комплексов с продуктами реакции – аспарагиновой и глутаминовой аминокислотами, а также с аналогами переходного состояния реакции [5, 9, 10]. Пространственная структура свободной аспарагиназы *Wolinella succinogenes* (Was) была установлена одной из первых среди белков этого семейства [5]. В [11] при более высоком разрешении исследованы две формы этого фермента, одна из которых идентична изученной ранее, а другая отличалась от нее заменой остатка пролина в положении 121 на серин (WasP121 и WasS121 соответственно). Отметим,

что обе формы существенно отличались глутаминовой активностью. При практически одинаковой аспарагиназной активности глутаминазная активность WasP121 оказалась почти на порядок выше, чем у WasS121. Комплексы этого фермента с аспаратом и глутаматом были также исследованы. Проанализировав пространственные структуры свободных ферментов и комплексов обоих ферментов с аспаратом и глутаматом, авторы пришли к выводу, что повышение глутаминазной активности связано с тем, что закрытая конформация, образование которой необходимо для протекания реакции, более стабильна в WasP121 из-за взаимодействия между СНδ-атомом пролина и ароматическим циклом тирозина активного центра. Вследствие этого фермент-субстратный комплекс образуется не только с аспарагином, но и с большим по объему глутамином. В [12] была получена мутантная форма L-аспарагиназы *Wolinnella succinogenes* (Was72), которая в положении 121 содержит пролин, но имеет две замены V23Q, K24T в С-концевом участке N-концевой подвижной петли, ограничивающей активный центр. Эта мутантная форма не только обладает повышенной устойчивостью к действию трипсина, но и при сохранении аспарагиназной активности в присутствии пролина в положении 121 характеризуется на порядок меньшей глутаминазной активностью.

В настоящей работе с целью исследования структурных основ, приводящих к изменению соотношения аспарагиназной и глутаминазной активности L-аспарагиназы Was72, выращены кристаллы свободной формы Was72 и ее комплексов с аспарагиновой и глутаминовой кислотами, которые использованы для рентгеноструктурного исследования. Для полученных кристаллов собраны дифракционные наборы, пригодные для установления пространственной структуры фермента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение и очистка L-аспарагиназы Was72. Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) (Novagen), несущего плазмиду pET28-Was72, кодирующую аспарагиназу, выращены на жидкой среде TRB (дрожжевой экстракт 2.4%, триптон 1.2%, буфер KH_2PO_4 – K_2HPO_4 89 мМ, MgSO_4 3 мМ, лактоза 0.5%, глицерин 0.5%, канамицин 90 мг/л) в условиях лактозной аутоиндукции при 37°C. Клетки собраны путем центрифугирования (9000 г) в течение 10 мин при 4°C и промыты в фосфатно-солевом буфере (рН 7.4) (PBS). Отмытые клетки были суспендированы в натрий-калий-фосфатном буфере концентрацией 5 мМ (рН 7.3), содержащем 0.5 М NaCl и 5 мМ EDTA, и разрушены на льду с помощью French Press Cell Disruptor (Thermo Electron Corp., Model FA-078A-E240). Фенил-

метилсульфонилфторид был прибавлен к клеточному лизату до концентрации 1 мМ. Модифицированная L-аспарагиназа Was72 выделена из клеточного лизата по следующей методике. Лизат, полученный при разрушении клеток продуцента, центрифугировали (16000 г) в течение 10 мин при 4°C. Осадок обрабатывали натрий-калий-фосфатным буфером концентрацией 5 мМ (рН 7.3), содержащим 0.2 М NaCl и 5 мМ ЭДТА. Смесь центрифугировали в описанных выше условиях. Аспарагиназу выделяли из полученного супернатанта с помощью комбинации двух типов ионообменной хроматографии на сорбентах SP- и Q-сефароза. Фракции, содержащие фермент, объединяли и переводили в воду MilliQ с помощью ультрафильтрации в системе VivaFlow с использованием мембраны с отсекающим размером пор 10 кДа, после чего раствор лиофилизовали на установке Martin Christ (Beta 1-8КС). Полученный препарат содержал аспарагиназу с чистотой белка более 95%.

Кристаллизация L-аспарагиназы Was72 и ее комплексов с L-аспаратом и L-глутаматом. Поиск условий и кристаллизация проведены методом диффузии паров растворителя в висячей капле с использованием приготовленных растворов PEG различной концентрации и разной молекулярной массы в интервале значений рН 5.5–7.2. Пригодные для структурного исследования кристаллы апо-формы L-аспарагиназы Was72 и ее комплексов получили при температуре 295 К. К 2 мкл раствора белка (концентрация 12 мг/мл) в фосфатном буфере 0.01 М (рН 7.2) на силиконированной стеклянной пластинке добавляли равный объем резервуарного раствора, содержащего 8%-ный PEG3350 в фосфатном буфере 0.1 М (рН 7.2). Стеклянной пластинкой с каплей накрывали ячейку, содержащую 0.5 мл резервуарного раствора. Кристаллы комплексов с аспаратом и глутаматом получены методом сокристаллизации. К капле раствора белка в фосфатном буфере 0.01 М (рН 7.2) добавляли равный объем осадителя, содержащего 15%-ный PEG3350, 0.2 М NaCl, 0.02% NaN_3 в 0.1 М натрий-калий-фосфатном буфере (рН 6.0) и 20 мМ L-аспарагиновой (или, соответственно, 20 мМ L-глутаминовой) кислоты. Кристаллы в форме удлиненных пластин появлялись через два–три дня и через неделю достигали максимального размера $0.05 \times 0.03 \times 0.1$ мм.

Получение и обработка дифракционных данных. Дифракционные наборы для кристаллов, предварительно замороженных в токе жидкого азота, собраны при 100 К на синхротроне SPring-8 (Япония), снабженном детектором PILATUS, на станции BL41XU. Для сбора данных использован метод вращения, длина волны составляла 0.8 Å, угол вращения 360°, угол качания 0.5°, расстояние кристалл–детектор равно 200 мм. Наборы были

Таблица 1. Статистические характеристики экспериментальных наборов рентгеновских данных кристаллов мутанта Was72 аспарагиназы *Wolinella succinogenes*, выращенных в апо-форме в двух разных пространственных группах и в присутствии L-аспартата (L-asp) и L-глутамата (L-glu)

Параметр	Апо-форма		Кристалл в присутствии L-asp	Кристалл в присутствии L-glu
	$P2_1$	$P22_12_1$	$P2_1$	$P2_1$
Пр. гр.	$P2_1$	$P22_12_1$	$P2_1$	$P2_1$
$a, b, c, \text{Å}$	62.82, 109.17, 87.7	60.64, 79.95, 108.51	64.92, 134.36, 73.15	64.76, 110.29, 89.90
$\alpha, \beta, \gamma, \text{град}$	90, 95.5, 90	90, 90, 90	90, 93.7, 90	90, 97.72, 90
$T, \text{К}$	100	100	100	100
$\lambda, \text{Å}$	0.8	0.8	0.8	0.8
Разрешение, Å	40.00–1.70 (1.79–1.70)*	40.00–1.75 (1.84–1.75)	40.00–1.65 (1.74–1.65)	40.00–2.00 (2.11–2.00)
Число независимых рефлексов	125360 (18244)	52936 (7512)	146129 (21413)	80519 (11557)
Повторяемость	2.91 (2.98)	4.72 (4.52)	2.89 (2.85)	2.80 (2.71)
Полнота набора, %	97.23 (97.28)	98.31 (97.11)	97.91 (97.58)	95.50 (94.21)
$I/\sigma(I)$	9.22 (3.65)	9.03 (4.58)	5.41 (3.20)	5.92 (2.12)
$R_{\text{mrgd-F}}$	0.06 (0.21)	0.06(0.16)	0.07 (0.22)	0.10 (0.33)

* В скобках приведены значения для последнего слоя.

обработаны с использованием программы iMosflm [13]. Статистика обработки наборов представлена в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

L-Аспарагиназа из грам-отрицательных бактерий *Wolinella succinogenes* (Was) наряду с аспарагиназой из *Erwinia chrysanthemi* используется при лечении лимфобластной лейкемии. Поэтому получение мутантных форм фермента с минимальной глутаминазной активностью представляет особый интерес. В [11] показано, что глутаминазная активность Was уменьшается при замене пролина в положении 121 (WasP121) на серин (WasS121). Авторы объяснили большую глутаминазную активность большей стабильностью закрытого состояния активного центра вследствие образования дополнительной связи между СНδ-атомом пролина и ароматическим кольцом остатка тирозина активного центра. Стабилизация закрытого состояния способствует связыванию в активном центре более объемного и менее специфичного субстрата глутамин. В [12] глутаминазная активность WasP121 уменьшена иным способом: посредством введения в подвижную петлю, ограничивающую активный центр, двух замен V23Q и K24T (мутант Was72). Замены не только увеличили устойчивость фермента к действию трипсина, но и привели к уменьшению почти на порядок глутаминазной активности. Определение пространственной структуры Was72 даст возможность проследить структурные изменения, способствующие уменьшению глутаминазной

активности белка в присутствии остатка пролина в положении 121.

Для получения кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного исследования, методом диффузии паров растворителя в висючей капле был проведен поиск условий с использованием растворов PEG с молекулярной массой 3350, 4000, 8000 в интервале концентраций 6–25% при значениях pH 6.5–7.2. Кристаллы апо-формы Was72 получены при использовании в качестве осадителя 15%-ного раствора PEG3350. Наилучшие кристаллы в присутствии L-аспартата и L-глутамата получены при добавлении в раствор осадителя хлорида натрия. Для выращенных кристаллов собраны дифракционные наборы до разрешения 1.70, 1.75 Å (две кристаллические формы апо-фермента), 1.65 Å (комплекс, полученный в присутствии L-аспартата), 2.00 Å (комплекс, полученный в присутствии L-глутамата). Статистические данные дифракционных наборов представлены в табл. 1. Кристаллы апо-формы фермента принадлежат двум модификациям (пр. гр. $P2_1$ и $P22_12_1$). Кристаллы предполагаемых комплексов, полученные методом сокристаллизации в присутствии аспарагиновой или глутаминовой кислоты, имеют одну и ту же пр. гр. $P2_1$, но разные параметры элементарной ячейки. Все обработанные наборы пригодны для решения пространственной структуры фермента методом молекулярного замещения.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-01148) в части выращивания кристаллов и получения рентгенодифракционных наборов и при поддержке Министерства науки и

высшего образования РФ в рамках Государственного задания ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН в части обработки рентгенодифракционных наборов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hortobagyi G.N., Yap H.Y., Wiseman C.L. et al.* // Cancer Treat. Rep. 1980. V. 64. P. 157.
2. *Roberts J., Schmid F.A., Rosenfeld H.J.* // Cancer Treat. Rep. 1979. V. 63. P. 1045.
3. *Carlsson H., Stockelberg D., Tengborn L. et al.* // Eur. J. Haematol. 1995. V. 55. P. 289.
4. *Aghaiypour K., Wlodawer A., Lubkowski J.* // Biochemistry. 2001. V. 40. P. 5655.
5. *Lubkowski J., Palm G.J., Gilliland G.L. et al.* // Eur. J. Biochem. 1996. V. 241. P. 201.
6. *Nguyen H.A., Su Y., Lavie A.* // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. P. 17664.
7. *Rohm K.H., Van Etten R.L.* // Arch. Biochem. Biophys. 1986. V. 244. P. 128.
8. *Krasotkina Ju., Borisiva A.A., Gervaziev Yu.V., Sokolov N.N.* // Biotechnol. Appl. Biochem. 2004. V. 39. P. 215.
9. *Kravchenko O.V., Kislitsin Yu.A., Popov A.N. et al.* // Acta Cryst. D. 2008. V. 64. P. 248.
10. *Miller M., Rao J.K.M., Wlodawer A., Gribskov M.R.* // FEBS Lett. 1993. V. 328. P. 275.
11. *Nguyen H.A., Durden D.L., Lavie A.* // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 41643. <https://doi.org/10.1038/srep41643>
12. *Sannikova E.P., Bulushova N.V., Cheperegin S.E. et al.* // Mol. Biotechnol. 2016. V. 58. P. 528. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9950-1>
13. *Otwinowski Z., Minor W.* // Methods Enzymol. 1997. V. 276. P. 307.