



ОСОБЕННОСТИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ МУТАНТНОЙ ФОРМЫ *L*-АСПАРАГИНАЗЫ *Wolinella succinogenes* В КОМПЛЕКСАХ С АСПАРАГИНОВОЙ И ГЛУТАМИНОВОЙ АМИНОКИСЛОТАМИ

© 2020 г. В. И. Тимофеев*, **, Н. Е. Жухлистова*, И. П. Куранова*, **, #

*Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИИ “Кристаллография и фотоника” РАН,
Россия, 119333, Москва, Ленинский пр., 59

**НИЦ “Курчатовский институт”, Россия, 123098, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

Поступила в редакцию 08.08.2019 г.

После доработки 21.10.2019 г.

Принята к публикации 31.10.2019 г.

Мутантная форма *L*-аспарагиназы *Wolinella succinogenes* (WASm), содержащая две замены V23Q и K24T в *N*-концевой подвижной петле, ограничивающей активный центр, имеет на порядок меньшую глутаминазную активность по сравнению с исходным ферментом (WAS). Пространственная структура WASm определена для апо-формы и комплексов WASm с *L*-аспарагиновой и *L*-глутаминовой аминокислотами при разрешении 1.70, 1.65 и 2.0 Å соответственно. Аминокислотные остатки подвижной петли локализованы на картах электронной плотности только частично. В активных центрах тетрамерной молекулы фермента в соответствующих комплексах локализованы с полной заселенностью аспарагиновая и глутаминовая аминокислоты и описано их окружение; их расположение в исходном и мутантном ферменте совпадает. Описано состояние активных центров в исследованных молекулах. Показано, что во всех субъединицах апо-фермента WASm и комплекса WASm/Glu активный центр находится в открытой конформации, в то время как в комплексе WASm/Asp активные центры трех субъединиц закрыты, а одной – открыты. Сравнение строения комплексов исходного и мутантного фермента позволяет предположить, что уменьшение глутаминазной активности WASm вызвано увеличением подвижности остатков *N*-концевой петли, что затрудняет образование каталитически активной закрытой формы при связывании менее специфичного субстрата (глутамин).

Ключевые слова: *L*-аспарагиназа, пространственная структура, фермент

DOI: 10.31857/S0132342320020165

ВВЕДЕНИЕ

Белки семейства аспарагиназ, широко распространенные среди микроорганизмов, относятся к классу амидогидролаз (КФ 3.5.1.1) и катализируют гидролиз аспарагина до аспарагиновой кислоты и аммиака [1]. При физиологических условиях эта реакция практически необратима. Большинство известных бактериальных аспарагиназ способно также гидролизовать *L*-глутамин с активностью, в некоторых случаях сравнимой с аспарагиназной [2, 3].

Замечательной особенностью *L*-аспарагиназ является их ярко выраженная антиопухолевая активность, связанная с тем, что в ряде опухолевых

клеток отсутствует фермент аспарагинсинтетаза, вследствие чего этот тип клеток не способен синтезировать аспарагин и зависит от доставки данной аминокислоты из внешних источников [4, 5]. Поэтому ряд представителей семейства *L*-аспарагиназ (*E. coli*, *E. chrisanthemi*, *E. carotovora*) находит широкое применение в качестве эффективных противоопухолевых агентов при лечении острых лимфобластных лейкозов, лимфо- и ретикулосарком [6, 7]. Однако антиопухолевая активность аспарагиназ сопровождается рядом побочных эффектов. Существенным недостатком аспарагиназ в качестве медицинских препаратов является их токсичность, частично связанная с присутствием глутаминазной активности. *L*-Глутамин играет важную роль в транспорте азота в крови, и длительное отсутствие этой аминокислоты при аспарагиназной терапии приводит к серьезным нарушениям в организме. Другим не-

Сокращения: WAS – *L*-аспарагиназа *Wolinella succinogenes*; WASm – мутантная форма *L*-аспарагиназы *Wolinella succinogenes*.

Автор для связи: (тел.: +7 (903) 169 79 56; эл.почта: in-na@ns.crys.ras.ru).

достатком препарата аспарагиназ является относительно низкая стабильность фермента в условиях применения [8, 9].

L-Аспарагиназа *Wolinella succinogenes* (WAS) отличается от ферментов из *E. coli* и *E. chrisanthemi* предельно низкой глутаминазной активностью, демонстрирует низкие побочные эффекты и высокую антиопухолевую активность, что делает ее наиболее пригодной для создания на ее основе оптимального фермента для медицинского применения [10–14].

Е.П. Санниковой и др. были проведены эксперименты по созданию на основе WAS аспарагиназы, сочетающей низкую иммуногенность с продолжительным действием [15]. Введением двух мутаций (V23Q, K24T) в *N*-концевую подвижную петлю молекулы WAS, ограничивающую активный центр и содержащую два каталитически важных остатка (Thr14, Tyr27), был получен фермент, устойчивый к действию трипсина (в данной работе обозначен как WASm) [15]. Мутантный фермент практически полностью сохранил исходную аспарагиназную активность, имел большую устойчивость к трипсину, а его глутаминазная активность оказалась на порядок ниже исходной [15].

В настоящей работе, с целью исследования особенностей строения мутантной формы, приводящих к изменению соотношения глутаминазной и аспарагиназной активности, были установлены пространственные структуры аспарагиназы WASm в апо-форме и в комплексах с продуктами реакции: *L*-аспарагиновой и *L*-глутаминовой кислотами. Проведен анализ полученных структур и их сравнение с соответствующими структурами исходной формы фермента WAS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пространственная структура *L*-аспарагиназы *Wolinella succinogenes*, установленная в 1996 г., была первой для бактериальных *L*-аспарагиназ [16]. В настоящее время пространственные структуры аспарагиназ, в том числе и в комплексах с продуктами реакции – *L*-аспарагиновой и *L*-глутаминовой аминокислотами – известны для ферментов из разных источников [17–21]. Недавно была установлена пространственная структура комплексов с продуктами реакции для двух форм *L*-аспарагиназы *W. succinogenes*, которые отличаются только одной заменой в полипептидной цепи (WASPro121 и WASSer121), но имеют разную глутаминазную активность [22].

Интерес к изучению структуры и функции *L*-аспарагиназ в значительной степени связан с широким применением этих белков в медицине. Однако задача получения идеального фермента, обладающего повышенной устойчивостью и минимальной токсичностью, частично связанной с

побочной глутаминазной активностью, до сих пор не решена.

На рис. 1 приведено сравнение аминокислотных последовательностей ряда аспарагиназ. В ферменте, рассматриваемом в данной работе (WASm), аминокислотные остатки валина и лизина в положениях 23 и 24 заменены соответственно на глутамин и треонин. Аминокислотные последовательности аспарагиназ очень схожи и содержат консервативный участок TGGTIAG на *N*-конце молекулы. *N*-Концевые аминокислотные остатки (12–40 в WAS) образуют подвижную петлю, ограничивающую активный центр. В подвижной петле расположены два остатка, принимающие участие в катализе. В аспарагиназе *W. succinogenes* это Thr14 и Tyr27 [16].

Предполагается [5, 17], что гидролиз амидной связи осуществляется посредством нуклеофильной атаки амидного атома углерода аспарагина гидроксильной группой треонина (Thr14 для WAS) с образованием ацилированного фермента и последующим гидролизом промежуточного соединения молекулой воды, связанной в активном центре [5, 17]. Расположенный в петле консервативный остаток тирозина (Tyr27 в WAS) поддерживает ориентацию треонина, оптимальную для нуклеофильной атаки. Большая часть аминокислотных остатков активного центра, участвующих в связывании субстрата, расположены в строго фиксированных участках полипептидной цепи, в то время как ограничивающая активный центр петля (остатки 12–40) изменяет свое положение в процессе катализируемой реакции, обеспечивая переход между открытой и закрытой конформациями активного центра. При закрытой конформации каталитически важный остаток треонина сближается с субстратом, в то время как в открытом состоянии активного центра остаток треонина удаляется от субстрата, вследствие чего реакция прекращается. Таким образом, на последовательных стадиях катализируемой реакции подвижная петля закрывает активный центр, приближая атакующий нуклеофил к субстрату (закрытая активная конформация) или открывает его после гидролиза амидной связи, способствуя удалению образовавшегося продукта реакции.

До недавнего времени низкую по сравнению с аспарагиназой глутаминазную активность фермента связывали преимущественно с пространственными затруднениями, возникающими при связывании глутамина, имеющего больший объем по сравнению со специфическим субстратом – аспарагином. В работе [22] было показано, что глутаминазная активность *L*-аспарагиназы *W. succinogenes* зависит от природы аминокислотного остатка в положении 121. Две формы аспарагиназы, отличающиеся только этим остатком (WASPro121 и WASSer121), на порядок

Таблица 1. Статистические характеристики набора и уточнения структур аспарагиназы в апо-форме и в комплексах с аспарагиновой и глутаминовой кислотами

PDB ID	6RUD	6RUE	6RUF
Разрешение, Å	30.0–1.7 (1.74–1.7)*	30.0–1.65 (1.69–1.65)	30.0–2.0 (2.07–2.0)
Количество рефлексов	119 054 (8759)	138 668 (10 211)	76 386 (5543)
<i>R</i> _{cryst} , %	16.2 (17.2)	16.9 (20.0)	21.5 (26.4)
<i>R</i> _{free} , %	19.4 (20.4)	19.9 (24.7)	25.9 (31.1)
Средний В-фактор, Å ²	10.97	17.17	18.59
Количество уточненных атомов			
Белка	9469	9412	9466
Растворителя	969	770	413
Лигандов	–	36	40
	RMS		
По длинам связей, Å	0.012	0.012	0.007
По углам, град	1.747	1.768	1.529
	Карта Рамачандрана		
Наиболее благоприятные области, %	98.5	99.0	98.0
Допустимые области, %	1.5	1.0	2.0
Запрещенные области, %	0.0	0.0	0.0

* В скобках приведены значения для последней оболочки.

различаются по глутаминазной активности, несмотря на то, что остаток 121 не каталитический и не взаимодействует со связанным субстратом непосредственно. Авторы показали, что в WASPro121 закрытое состояние фермента дополнительно стабилизируется из-за СН/π-взаимодействия колец пролина 121 и каталитического тирозина [22, 23]. В результате повышается стабильность закрытой конформации активного центра и вероятность ее образования при связывании менее специфического субстрата глутамин, что и приводит к более высокой глутаминазной активности.

Е.Р. Санниковой и др. [15] в экспериментах по инженерии фермента, устойчивого к действию трипсина, на основе *L*-аспарагиназы *Wolinella succinogenes* (WAS, идентична WASPro121) было обнаружено, что замена двух аминокислотных остатков – V23Q и K24T в ограничивающей активный центр подвижной петле – не только обеспечивает большую устойчивость фермента к гидролизу трипсином, но и на порядок уменьшает его глутаминазную активность, несмотря на присутствие пролина в положении 121. Мутантная форма *L*-аспарагиназы WASPro121, содержащая замены V23Q и K24T, обозначена здесь как WASm.

Чтобы исследовать возможные причины понижения глутаминазной активности при замене двух аминокислотных остатков в подвижной петле и проследить влияние замен на конформацию активного центра, мы установили пространственные структуры WASm в апо-форме и в комплексах с *L*-аспарагиновой и *L*-глутаминовой

аминокислотами – WASm/Asp и WASm/Glu. Кристаллы вырастили методом диффузии паров растворителя; дифракционные наборы собрали на источнике синхротронного излучения SPring 8 [25].

Кристаллы апо-формы и обоих комплексов фермента, принадлежащие к пространственной группе *P*₂₁, содержали тетрамерную молекулу фермента в независимой части ячейки. Пространственные структуры апо-формы и обоих комплексов WASm установлены методом молекулярного замещения с использованием в качестве модели координат *L*-аспарагиназы *Wolinella succinogenes* (PDB_ID: 1WSA). Статистические параметры уточнения приведены в табл. 1.

Гомотетрамерная молекула WASm (а именно эта форма фермента обладает биологической активностью) показана на рис. 2. При совмещении субъединиц тетрамера по Cα-атомам среднеквадратичное отклонение между субъединицами незначительно и колеблется от 0.08 до 0.117 Å. Молекула состоит из двух димеров, каждый из которых содержит два полностью сформированных активных центра (так называемые интимные димеры, в WASm это димеры AC и BD). Каждый активный центр включает аминокислотные остатки из обеих субъединиц димера.

Как и в большинстве пространственных структур *L*-аспарагиназ, не все аминокислотные остатки подвижной петли были локализованы на картах электронной плотности. Не были локализованы и остатки Glu23 и Thr24, где произ-

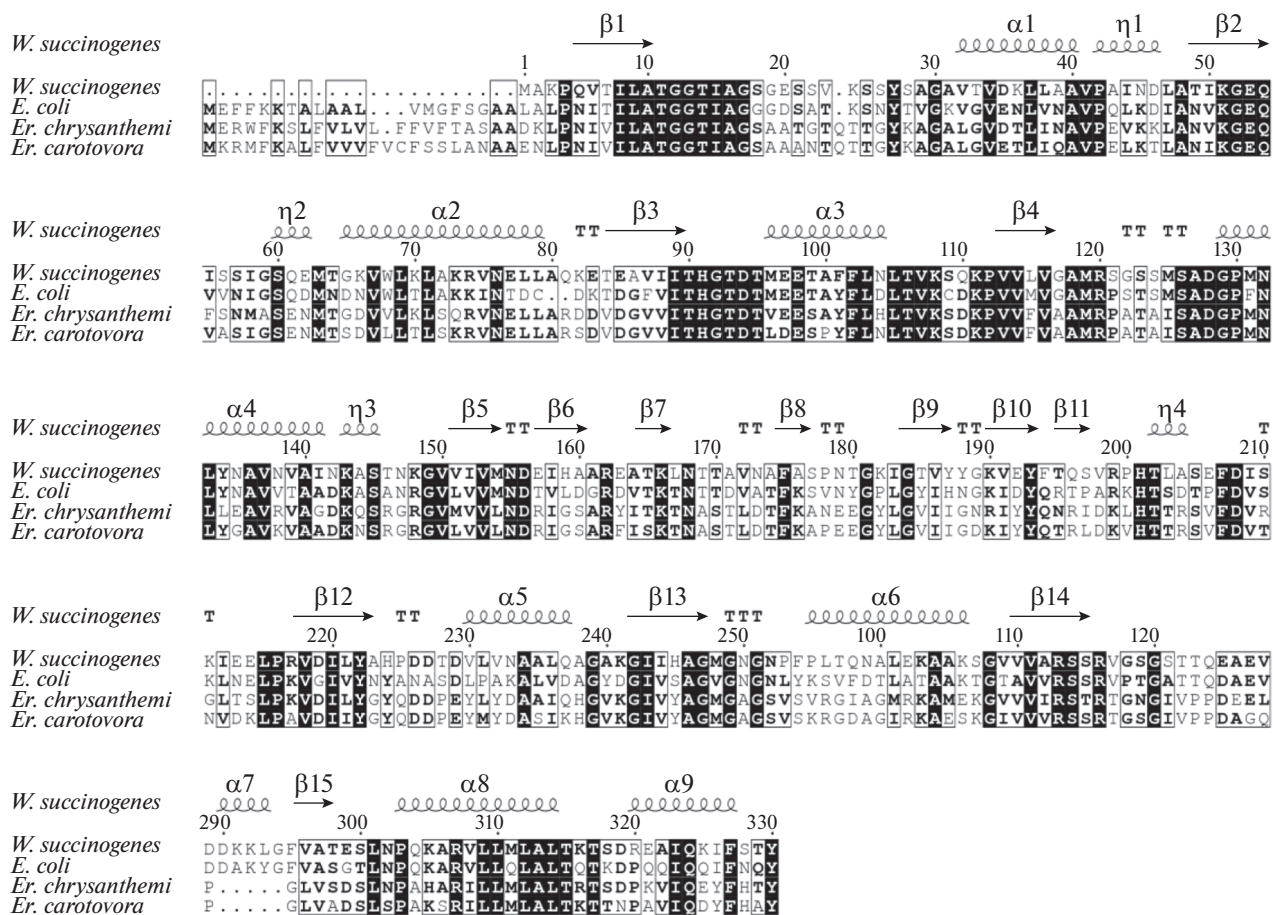


Рис. 1. Сравнение последовательностей некоторых бактериальных *L*-аспарагиназ. Стрелками и спиралями указаны соответствующие элементы вторичной структуры в *L*-аспарагиназе WASm.

ведены замены, а также каталитически важный остаток тирозина (Tyr27). Однако предполагаемый нуклеофил – Thr14 – виден во всех структурах.

Лиганды – *L*-аспарагиновая и *L*-глутаминовая аминокислоты, связанные в активных центрах соответствующих комплексов WASm/Asp и WASm/Glu, – локализованы с полной заселенностью (рис. 3). Конформация активного центра в каждой из субъединиц обоих комплексов была охарактеризована на основе анализа ближайшего окружения связанных лигандов.

На рис. 4а, 4б показана аспарагиновая кислота в активных центрах субъединиц А и С интимного димера АС комплекса WASm/Asp. В обеих субъединицах в связывании кислорода α -карбоксильной группы участвуют атом азота основной цепи и γ -гидроксил Ser60. α -Аминогруппа лиганда, являющаяся главным детерминантом специфичности аспарагиназ, имеет водородную связь с карбонильным кислородом Gln61 и карбоксильной группой Asp94. В связывании α -аминогруппы участвует также карбоксильная группа Glu287 из соседней субъединицы димера.

β -Карбоксильная группа связана с азотом основной цепи Ala118. Главное отличие в окружении лигандов в разных субъединицах касается расстояния между каталитически важным остатком треонина Thr14 и лигандом. В субъединице С, также как и в субъединицах В и D комплекса WASm/Asp, расстояние между OD2 атомом β -карбоксильной группы аспарагиновой кислоты и OG1_Thr14 составляет 3.08 Å, т.е. лиганд и остаток треонина находятся на расстоянии водородной связи. В субъединице А соответствующее расстояние составляет 12.3 Å. Известно, что близкое расположение Thr14 и лиганда наблюдается только при закрытой конформации активного центра [22, 24]. Следовательно, в субъединицах В, С и D комплекса WASm/Asp активный центр находится в закрытой конформации и только в субъединице А – в открытой.

При совмещении субъединицы А комплекса WASm/Asp последовательно со всеми субъединицами комплекса WASm/Glu оказалось, что окружение глутаминовой кислоты во всех четырех активных центрах этого комплекса практически

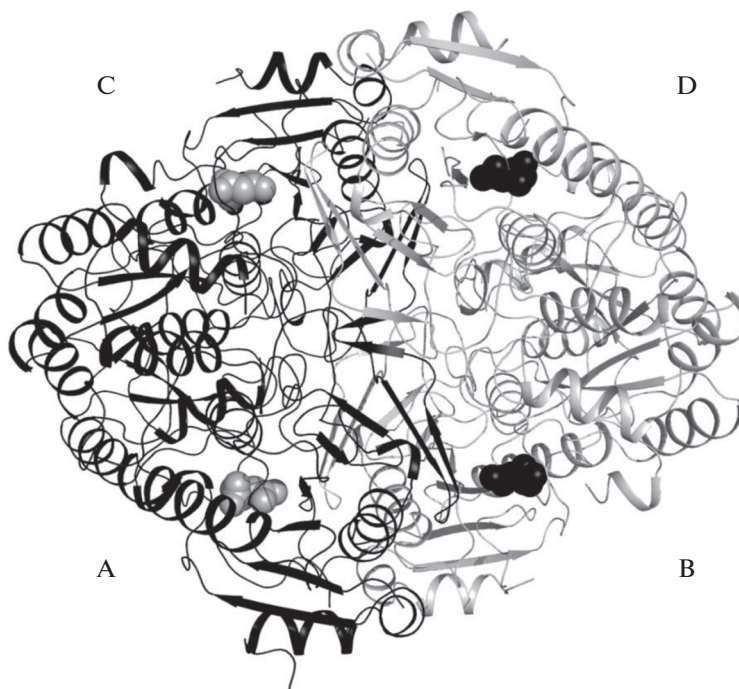


Рис. 2. Тетрамерная молекула мутантной формы *L*-аспарагиназы *W. succinogenes* (WASm). Темно-серым и светло-серым цветом обозначены два интимных домена, содержащих полностью сформированные активные центры. Сферами показан связанный в активных центрах лиганд (аспарагиновая кислота).

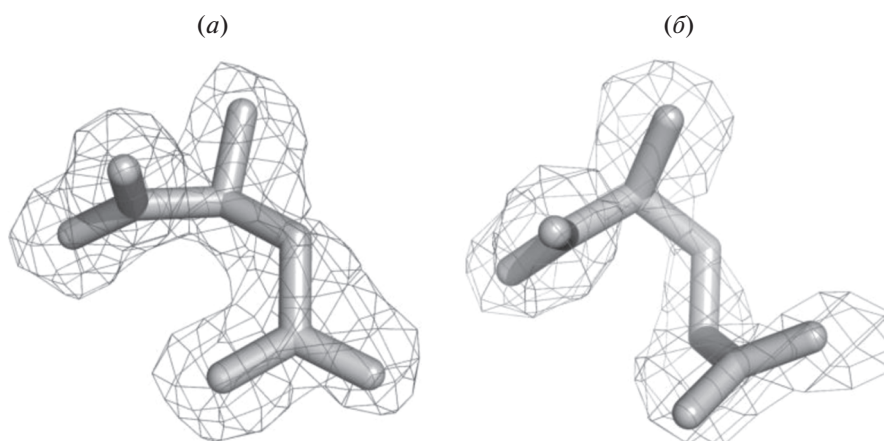


Рис. 3. Молекулы аспарагиновой (а) и глутаминовой (б) кислот, локализованные в активном центре *L*-аспарагиназы WASm. Электронная плотность рассчитана с коэффициентами $|Fo| - |Fc|$ при $\sigma = 2$. Лиганд был исключен при расчете карт электронной плотности.

совпадает с окружением аспарагиновой кислоты в субъединице А, имеющей открытую конформацию активного центра, хотя из-за большого объема глутаминовой кислоты расстояния между лигандом и группами ближайшего окружения в двух комплексах несколько отличаются (рис. 4б). При этом расстояние между атомами OE1_Glu и OG1_Thr14Å во всех субъединицах превышает 12 Å, что говорит об открытой конформации активного

центра в данном комплексе. Показано также, что все активные центры в апо-ферменте WASm находятся в открытой конформации.

Таким образом, в мутантном ферменте WASm, как и в других аспарагиназах, образование закрытой конформации активного центра при связывании глутаминовой кислоты и глутамина затруднено.

Установленное состояние активных центров подтверждается и сравнением данных структур

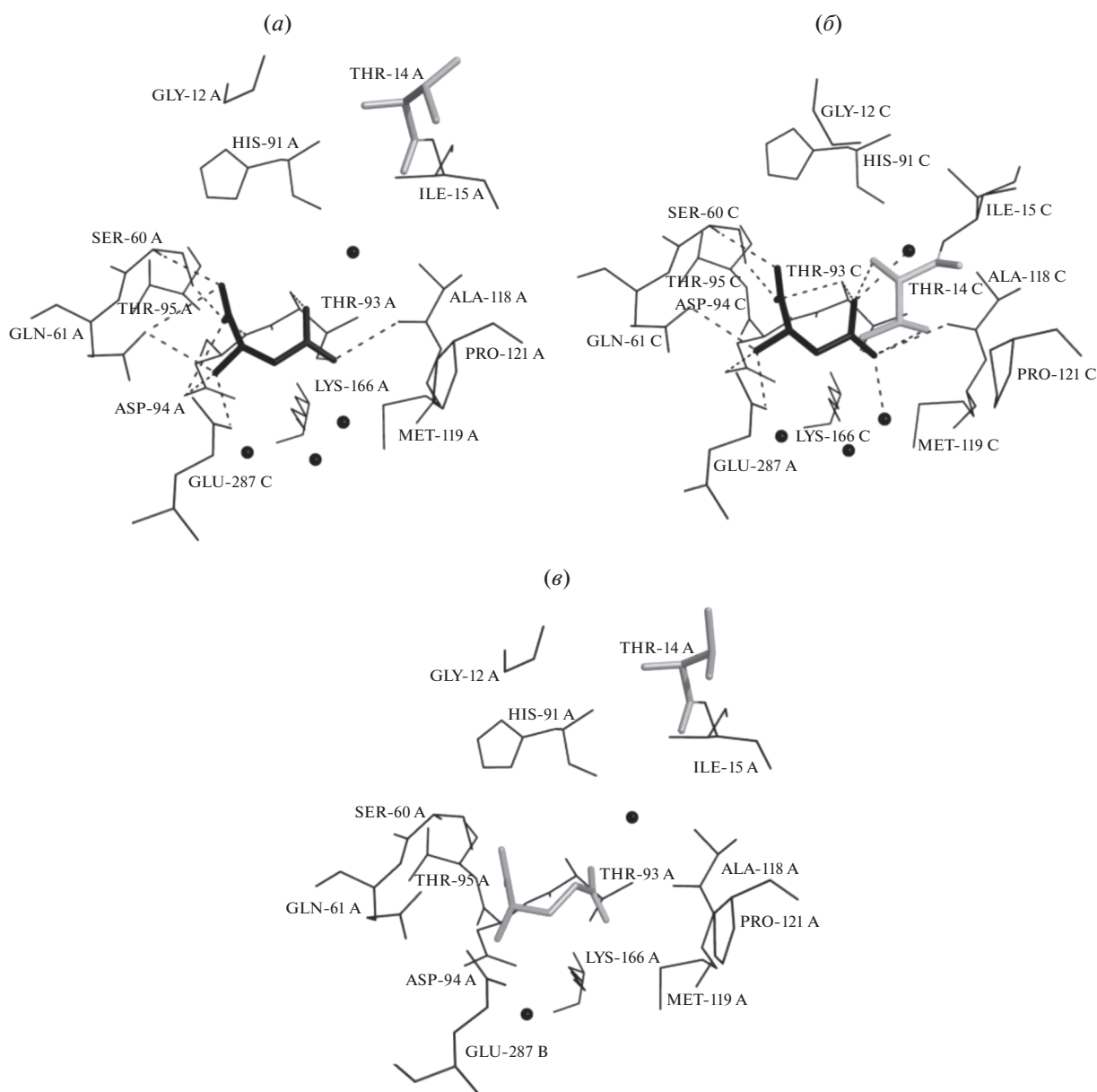


Рис. 4. Окружение лигандов в активном центре комплексов WASm с аспарагиновой (WASm/Asp) и глутаминовой (WASm/Glu) кислотой. (а) *L*-Аспартат в субъединице А (открытая конформация), (б) в субъединице С (закрытая конформация); (в) *L*-глутамат в субъединице А WASm/Glu (открытая конформация). Лиганды показаны утолщенными черными линиями. Черные сферы – молекулы воды. Светло серым показан аминокислотный остаток Thr14.

со структурами комплексов *L*-аспарагиназы WAS (WASPro121и WASSer121), описанными в работе [22], где впервые на картах электронной плотности были локализованы все аминокислотные остатки подвижной петли. В подвижной петле авторы выделили три ключевых шарнирных аминокислотных остатка Gly12, Ile15, Thr33, которые обеспечивают повороты этого участка полипептидной цепи и контролируют переходы между открытой и закрытой конформациями активного центра. Два первых остатка входят в консервативную для аспарагиназ последовательность TGGTIAG. Пер-

вый шарнирный остаток Gly12 позволяет петле поворачиваться к лиганду или от него. Около Ile15, который действует как внешний шарнир, полипептидные цепи в открытой и закрытой формах встречаются и снова расходятся у следующего остатка.

На рис. 5а, 5б показаны участки *N*-концевой подвижной петли в совмещенных по $C\alpha$ -атомам структурах исходной *L*-аспарагиназы (WAS) и мутантного фермента WASm, представляющих соответственно закрытую (а) и открытую (б) кон-

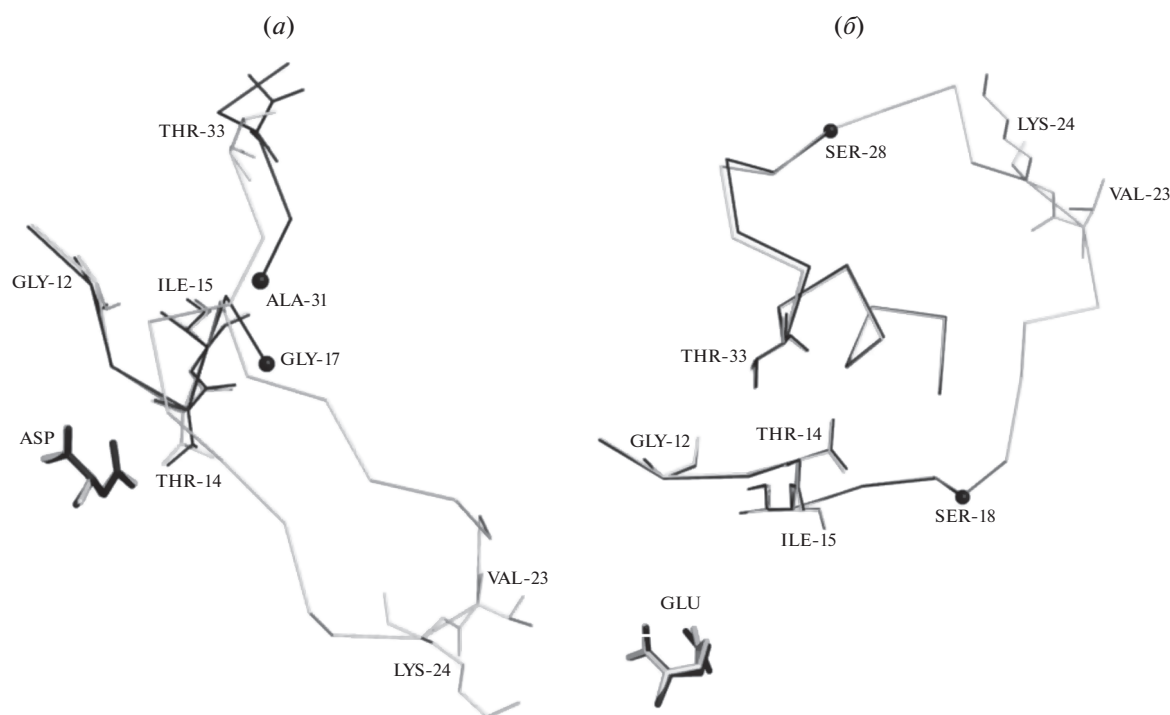


Рис. 5. Участки подвижных петель в совмещенных по $C\alpha$ -атомам субъединицах соответствующих комплексов исходной (WAS) и мутантной (WASm) *L*-аспарагиназы (а): WAS/Asp и субъединица С WASm/Asp (закрытые конформации); (б): WAS/Glu и субъединица А WASm/Glu (открытые конформации).

формации петли. Несмотря на то, что в мутантном ферменте WASm ряд аминокислотных остатков петли не локализован, первый и второй реперные остатки, Gly12 и Ile15, где меняет направление полипептидная цепь, следуя далее по открытому либо закрытому пути, хорошо видны. Как представлено на рис. 5, после реперного остатка Ile15 направление полипептидной цепи в мутантном ферменте меняется и следует по направлению, приводящему соответственно к закрытой (а) и открытой (б) конформации активного центра.

Сравнение структур комплексов мутантного фермента с соответствующими структурами исходной *L*-аспарагиназы (WAS), где локализованы все аминокислотные остатки подвижной петли, показывает, что замены в WASm расположены на участке, достаточно удаленном от связанного лиганда: расстояния между $C\alpha$ -атомами Val23, Lys24 и ближайшим атомом кислорода β -карбоксильной группы аспарагиновой кислоты при закрытой конформации петли равны соответственно 16.00 и 14.65 Å. Следовательно, введенные замены не могут влиять на глутаминазную активность, непосредственно взаимодействуя с субстратом. Однако замены могут оказывать влияние на степень подвижности петли, поскольку изменяется характер взаимодействия остатков в положении 23 и 24 с ближайшим окружением.

Мутации остатков 23 и 24 были промоделированы с использованием координат *L*-аспарагиназы WAS. На рис. 6а–6г показано взаимодействие с ближайшим окружением остатков 23 и 24 в исходном ферменте и в модели мутантного фермента при открытой и закрытой конформации активного центра. Видно, что характер взаимодействия боковых цепей остатков 23 и 24 с ближайшим окружением в исходном и мутантном ферменте различны. Так, в закрытой форме при замене V23 на Q23 наблюдается короткий контакт (1.6 Å) с A43 из соседней субъединицы (рис. 6г), что делает невыгодной такую закрытую конформацию петли. Кроме того, после введения замен V23Q, K24T существенно меняется и электростатический потенциал поверхности на данном участке (рис. 7а–7б).

Таким образом, перечисленные факторы могут увеличить подвижность гибкой петли в мутантном ферменте и тем самым затруднить образование закрытой конформации активного центра в присутствии глутамин, испытывающего стерические препятствия при связывании. Об увеличении подвижности петли после введения замен можно судить и по отсутствию на картах электронной плотности WASm консервативного остатка тирозина (Tyr27), обычно хорошо определяемого в структурах аспарагиназ. Возможно, большая подвижность каталитически важного остатка тирозина препятствует СН/ π -взаимодействию

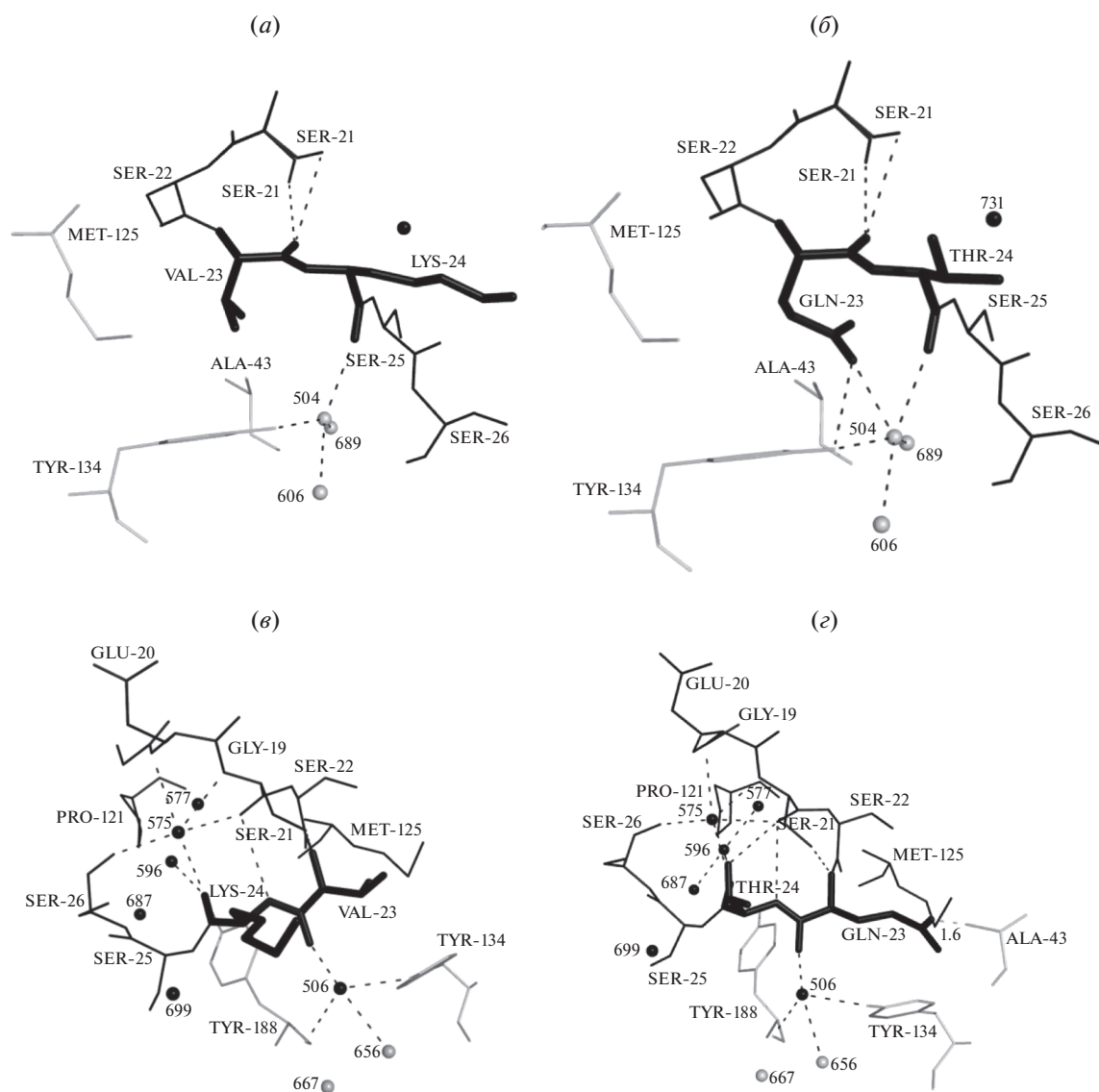


Рис. 6. Ближайшее окружение ($\geq 4 \text{ \AA}$) фрагмента петли 21–26, содержащего аминокислотные остатки 23 и 24, в исходной и мутантной формах *L*-аспарагиназы *W. succinogenes*: (а, в) открытая конформация, (б, г) закрытая конформация. Остатки 23 и 24 обозначены утолщенными линиями черного цвета. Серым цветом показаны аминокислотные остатки из соседней субъединицы. Серые сферы – молекулы воды.

между ароматическим кольцом тирозина и атомами водорода пролина 121. Отсутствие такого взаимодействия дестабилизирует закрытую форму и приводит к уменьшению глутаминазной активности мутантного фермента. Более точно определить поведение аминокислотных остатков подвижной петли в мутантном ферменте предполагается с использованием метода молекулярной динамики.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мутантная *L*-аспарагиназа V23Q, L24T (WASm) получена, как описано в [15, 16].

Кристаллы апо-формы и комплексов WASm с *L*-аспарагиновой и *L*-глутаминовой аминокислотами выращены сокристаллизацией в присутствии соответствующих лигандов методом диффузии паров растворителя в висючей капле, как описано в [25]. Все кристаллы принадлежали пространственной группе $P2_1$ и содержали одну тетрамерную молекулу фермента в независимой части ячейки. Дифракционные наборы экспериментальных данных от предварительно замороженных кристаллов свободного фермента и его комплексов были собраны в токе паров азота при температуре 100 К на источнике синхротронного излучения SPring-8 (Япония), как описано в [16].

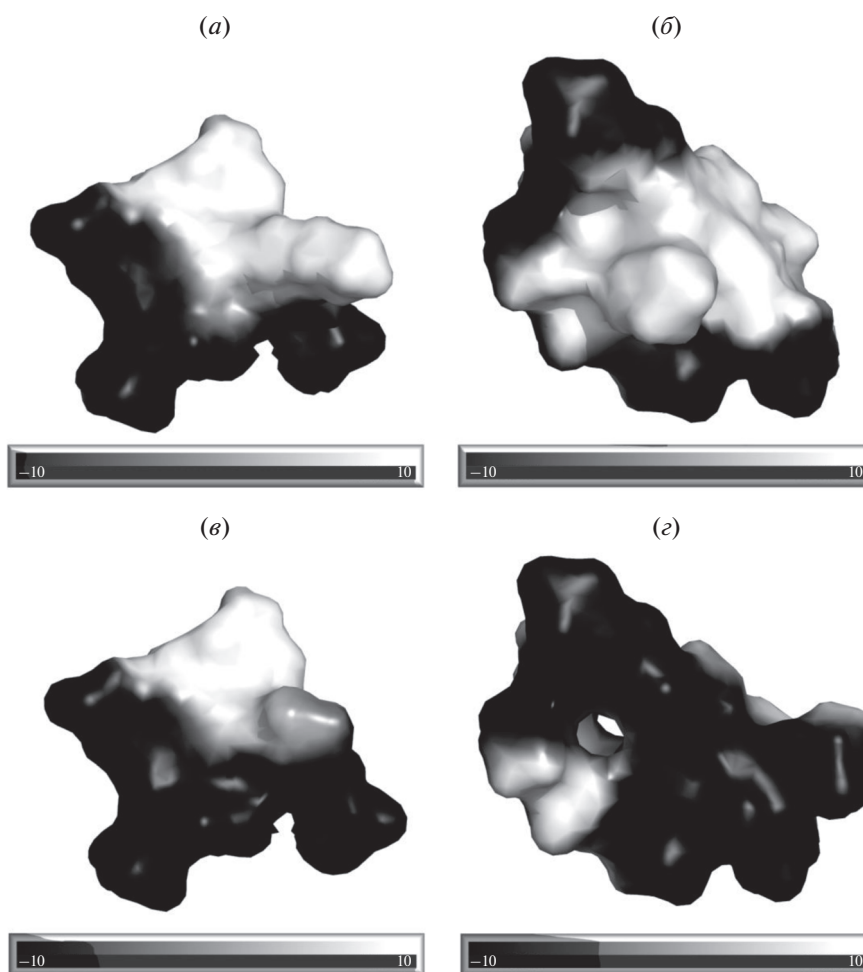


Рис. 7. Электростатический потенциал поверхности в окружении аминокислотных остатков 23 и 24 при открытой (слева) и закрытой (справа) конформации активного центра: (а) в исходном ферменте WAS, (б) в модели мутантного фермента WASm. Участки с отрицательным потенциалом обозначены черным, участки с положительным потенциалом – серым цветом. Шкала оттенков представлена в единицах kT/e в интервале от -10 до $+10$.

Структуры аспарагиназы в апо-форме и в комплексах с *L*-аспарагановой и *L*-глутаминовой кислотами решены методом молекулярного замещения с использованием программы Phaser [26] и координат аспарагиназы (PDB_ID: 1WSA) в качестве стартовой модели. Для уточнения структуры использовали программу Refmac [27]. Ручную правку моделей проводили при помощи программы Coot [28], используя карты электронной плотности, рассчитанные с коэффициентами $2|Fo|-|Fc|$ и $|Fo|-|Fc|$. На картах электронной плотности локализованы молекулы воды, а в активных центрах комплексов на разностных синтезах найдена электронная плотность, соответствующая аспарагиновой или глутаминовой кислоте (рис. 1а, 1б). На картах электронной плотности во всех структурах не были локализованы аминокислотные остатки 1–2, в структуре апо-формы в соответствующих субъединицах аминокислотные остатки 18А–27А, 21В–27В, 18С–28С, 20D–28D; в комплексе

с аспарагиновой кислотой – остатки 18А–27А, 18В–31В, 18С–30С, 20D–30D; в комплексе с глутаминовой кислотой – остатки 19–29 (субъединицы А, В, D), 17С–27С.

Статистические характеристики уточнения приведены в табл. 1. Координаты атомных моделей депонированы в Международный банк белковых данных (PDB_ID: 6RUD, 6RUE, 6RUF).

Анализ и сравнение пространственных структур проводили с использованием программ COOT, LSQ из пакета CCP4, PISA, PyMol [19–22]. Межмолекулярные и межсубъединичные контакты были определены с использованием программы CONTACT комплекса CCP4 и PISA [29, 30]. Моделирование замен 23 и 24-го остатков было проведено программой PyMol на основе координат исходного фермента [31]. Электростатический потенциал поверхности в окружении аминокислотных остатков 23 и 24 в открытой и закрытой конфор-

магии активного центра определен программой PyMol с использованием метода, описанного в [32].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-01148) в части решения и уточнения пространственных структур и при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Государственного задания ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН в части анализа пространственных структур.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Howard J.B., Carpenter F.J. // J. Biol. Chem. 1972. V. 217. P. 1020–1030.
- Lubkowski J., Wlodawer A., Ammon H.L., Copeland T.D., Swain A.L. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 10257–10265.
- Lubkowski J., Wlodawer A., Housset D., Weber T., Ammon H.L., Murphy K.C., Swain A.L. // Acta Crystallog. D. 1994. V. 50. P. 826–832.
- Broom J.D. // J. Exp. Med. 1968. V. 127. P. 1055–1072.
- Rohm K.H., Van Etten R.L. // Arch. Biochem. Biophys. 1986. V. 244. P. 128–136.
- Mc Credie K.B., Ho D.H., Freireich E.J. // CA. Cancer J. Clin. 1953. V. 23. P. 220–227.
- Chen S.-H. // Pediatr. Neonatol. 2014. V. 56. P. 1–7.
- Parmentier J.H., Maggi M., Tarasco E., Scotti C., Avramis V.I., Mittelman S.D. // Leuk. Res. 2015. V. 39. P. 757–762.
- Warrell R.P., Chou T.C., Gordon C., Tan C., Roberts J., Sternberg S.S., Philips F.S., Young C.W. // Cancer Res. 1980. V. 40. P. 4546–4551.
- Durden D.L., Distasio J.A. // Cancer Research. 1980. V. 40. P. 1125–1129.
- Durden D.L., Distasio J.A. // International Journal of Cancer. 1981. V. 27. P. 59–65.
- Van den Berg H. // Leuk. Lymphoma. 2011. V. 52. P. 168–178.
- Covini D., Tardito S., Bussolati O., Chiarelli L.R., Pasquetto M.V., Digilio R., Valentini G., Scotti C. // Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery. 2012. V. 7. P. 4–13.
- Shrivastava A., Khan A.A., Khurshid M., Kalam M.A., Jain S.K., Singhal P.K. // Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2015. V. 100. P. 1–10.
- Sannikova E.P., Bulushova N.V., Cheperegin S.E., Gubaydullin I.I., Chestukhina G.G., Ryabichenko V.V., Zalanin I.A., Kotlova E.K., Konstantinova G.E., Kubasova T.S., Shtil A.A., Pokrovsky V.S., Yarotsky S.V., Efremov B.D., Kozlov D.G. // Mol. Biotechnol. 2016. V. 58. P. 528–539.
- Lubkowski J., Palm G.J., Gilliland G.L., Derst Ch., Rohm K.H., Wlodawer K.-H.A. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 241. P. 201–207.
- Aghaiypour K., Wlodawer A., Lubkowski J. // Biochemistry. 2001. V. 40. P. 5655–5664.
- Nguyen H.A., Su Y., Lavie A. // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. P. 17664–17676.
- Krasotkin Ju., Borisiva A.A., Gervaziev Yu.V., Sokolov N.N. // Biotechnol. Appl. Biochem. 2004. V. 39. P. 215–221.
- Kravchenko O.V., Kislitsin Yu.A., Popov A.N., Nikonov S.V., Kuranova I.P. // Acta Cryst. 2008. V. D64. P. 248–256.
- Miller M., Rao J.K.M., Wlodawer A., Gribskov M.R. // FEBS Lett. 1993. V. 328. P. 275–279.
- Nguyen H.A., Durden D.L., Lavie A. // Scientific Reports. 2017. 7:41643.
- Palm G.J., Lubkowski J., Derst C., Schleper S., Rohm K.H., Wlodawer A. // FEBS Lett. 1996. V. 390. P. 211–216.
- Zondlo N.J. // Acc. Chem. Res. 2013. V. 46. P. 1039–1049.
- Тимофеев В.И., Булушова Н.В., Жухлистова Н.Е., Куранова И.П. // Кристаллография. 2019. Т. 64. С. 897–900.
- McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D., Winn M.D., Storoni L.C., Read R.J. // J. Appl. Cryst. 2007. V. 40. P. 658–674.
- Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. // Acta Cryst. D. 1997. V. 53. P. 240–255.
- Emsley P., Cowtan K. // Acta Cryst. D. 2004. V. 60. P. 2126–2132.
- Collaborative Computational Project, Number 4. “The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography” // Acta Cryst. D. 1994. V. 50. P. 760–763.
- Krissinel E., Henrick K. // J. Mol. Biol. 2007. V. 372. P. 774–797.
- Schrödinger LLC. // The PyMOL Molecular Graphics System. Version 1.8. 2015.
- Baker N.A. // Methods in Enzymology. 2004. V. 383. P. 94–118.

The Peculiarity of Three Dimensional Structure of Mutant Form of *L*-Asparaginase *Wolinella succinogenes* Complexed with *L*-Aspartic and *L*-Glutamic Acid

V. I. Timofeev*, **, N. E. Zhukhlistova*, **, and I. P. Kuranova*, **, #

Phone: +7 (903) 169-79-56; e-mail: inna@ns.crys.ras.ru

*Shubnikov Institute of Crystallography of Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics", Russian Academy of Sciences, Leninski pr. 59, Moscow, 119333 Russia

**National Research Center Kurchatov Institute, pl. Ak. Kurchatova 1, Moscow, 123098 Russia

The mutant form of *L*-asparaginase *Wolinella succinogenes* (WASm) which contains two replacements V23Q and K24T in the *N*-terminal flexible loop limiting an active site has a glutaminase activity one order of magnitude lower than original enzyme (WAS). The three dimensional structure was determined for apo form and complexes of WASm with *L*-aspartic and *L*-glutamic acids at resolution 1.70, 1.65 и 2.0 Å respectively. The residues of *N*-terminal flexible loop were partly localized. An aspartic and glutamic acids in corresponding complexes were localized with full occupancy in all active sites of the tetrameric enzyme molecules and their nearest vicinity was described. Using comparison with the structure of corresponding complexes of an original enzyme it was shown that positions of bound ligands in original and mutant enzymes coincide. The conformation of active sites in all molecules was considered. It was found that all active sites in apo enzyme and in complex of WASm with glutamate (WASm/Glu) have open conformation whereas the active sites in three subunits of WASm/Asp complex have closed conformation and only in one subunit the conformation is open. Based on the comparison of three dimensional structures of mutant and original enzyme and evaluating the impact of replacements, it was assumed that the decrease in glutaminase activity of WASm is caused by high mobility of the residues of *N*-terminal loop which complicates the formation of a catalytically active closed form of the active site after binding of less specific substrate (glutamine).

Keywords: *L*-asparaginase, protein spatial structure, enzyme