

На правах рукописи

Мезенцев Юрий Владимирович

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ
L-АСПАРАГИНАЗ

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2007

Работа выполнена в Государственном учреждении Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Иванов Алексей Сергеевич

Официальные оппоненты: кандидат биологических наук
Эльдаров Михаил Анатольевич

доктор биологических наук, профессор
Шумянцева Виктория Васильевна

Ведущая организация: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет

Защита диссертации состоится «11» октября 2007 года в 14.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 001.010.01 при Государственном учреждении Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук по адресу 119121, г. Москва, ул. Погодинская, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного учреждения Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук

Автореферат разослан « » сентября 2007 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат химических наук

Карпова Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Бактериальные L-аспарагиназы (L-аспарагинамидогидролаза КФ 3.5.1.1) используются в терапии опухолевых заболеваний и считаются одним из самых эффективных средств при лечении острого лимфобластного лейкоза. Объектом действия L-аспарагиназы является периплазматический L-аспарагин, ее главный субстрат. Снижение периплазматической концентрации L-аспарагина приводит в результате к снижению его количества внутри клетки. В отличие от нормальных клеток в лейкозных клетках экспрессия L-аспарагинсинтетазы выражена слабо или отсутствует вовсе. Поэтому опухолевые клетки не могут отреагировать адекватно на снижение внутриклеточного уровня L-аспарагина, в то время как в нормальных клетках уровень L-аспарагина своевременно восполняется. В свою очередь нехватка этой аминокислоты приводит к ингибированию белкового синтеза в клетке, что в итоге вызывает ее апоптоз. Более того, L-аспарагиназа действует исключительно в периплазматическом пространстве без проникновения внутрь клетки, что принципиально отличает механизм ее действия от прочих противоопухолевых препаратов (Тимаков А.М. и др., 2003).

Однако продолжительная терапия с использованием препаратов бактериальных L-аспарагиназ сопровождается большим количеством побочных эффектов вплоть до развития анафилактического шока. С учетом токсического действия разных препаратов бактериальных L-аспарагиназ к клиническому применению в настоящее время допущены лишь две L-аспарагиназы бактериального происхождения, а именно L-аспарагиназы из *Escherichia coli* и *Erwinia chrysanthemi*. Согласно общепринятому мнению, токсический эффект бактериальных L-аспарагиназ является следствием проявления этими ферментами глутаминазной активности. Другой причиной токсического эффекта бактериальных L-аспарагиназ по мнению ряда исследователей является β -аспартилпептидная активность этих ферментов (Kelo E. *et al.*, 2002). Более того, считается, что белки с из-за мультисубъединичной структуры бактериальные L-аспарагиназы вызывают аллергическую реакцию у пациентов в процессе энзимотерапии их препаратами (Goodsell D.S., 2005).

Большинство бактериальных L-аспарагиназ является гомотетрамером с четырьмя активными центрами. Если учесть тот факт, что их активный центр формируется в области контакта между двумя субъединицами, то очевидна роль олигомеризации L-аспарагиназы в процессе формирования ее активных центров и, как следствие, в ее субстратной специфичности. Димер L-аспарагиназы, имея два активных центра, не способен расщеплять L-аспарагин, и лишь только тетрамер L-аспарагиназы обладает такой активностью (Ehrman M. *et al.*, 1971; Kotzia G.A. *et al.*, 2005; Kozak M. *et al.*, 2000; Krasotkina J. *et al.*, 2004;

Lubkowski J. *et al.*, 2003; Marlborough D.I. *et al.*, 1975; Shifrin S. *et al.*, 1974) .Несмотря на широкий интерес, проявляемый на протяжении многих лет к L-аспарагиназе, в литературе практически отсутствуют какие либо данные по олигомеризации этого фермента.

На сегодняшний день существует множество доступных методов, с помощью которых возможно исследование белок-белковых взаимодействий и, в частности, олигомеризации мультисубъединичных белков. Многие экспериментальные подходы позволяют регистрировать белок-белковые взаимодействия в широком диапазоне концентраций, однако не все дают возможность оценивать стехиометрию образующихся комплексов.

Существуют также биоинформационные подходы, позволяющие предсказывать возможность белок-белковых взаимодействий, оценивать устойчивость образующихся белковых комплексов, определять специфические контактные участки в белок-белковых взаимодействиях и т.д.

Совместное использование экспериментальных и биоинформационных методов дает возможность более эффективно решать различные задачи, направленные на исследование белок-белковых взаимодействий и, в частности, процесса олигомеризации мультисубъединичных белков.

Цель и задачи исследования

Цель работы состояла в определении молекулярных основ и специфичности белок-белковых взаимодействий при олигомеризации бактериальных L-аспарагиназ.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Построить модели пространственных структур L-аспарагиназ *Erw. carotovora*, *Helicobacter pylori J99* и *Helicobacter pylori 26695*, а также модели химерных тетрамеров, образующихся в экспериментах по исследованию специфичности процесса олигомеризации бактериальных L-аспарагиназ.

2. Выполнить сравнительный молекулярно-графический анализ области контакта между субъединицами для L-аспарагиназ из *Erwinia carotovora* и *Erw. chrysanthemi* и для моделей химерных тетрамеров.

3. Разработать методику иммобилизации, диссоциации и восстановления олигомерной структуры бактериальных L-аспарагиназ на поверхности оптического чипа для экспериментального изучения олигомеризации данных ферментов с помощью технологии оптического биосенсора.

4. Оценить специфичность процесса олигомеризации бактериальных L-аспарагиназ с помощью оптического биосенсора Biacore 3000.

Научная новизна работы

Впервые был исследован процесс олигомеризации бактериальных L-аспарагиназ с помощью комбинации методов молекулярного моделирования и технологии оптического биосенсора.

Были построены модели тетрамеров L-аспарагиназ из *H. pylori J99* и *H. pylori 26695*, для которых на данный момент отсутствуют кристаллографические данные.

Для L-аспарагиназ из *E. coli* и из *Erw. carotovora* были определены ключевые аминокислотные остатки контактных областей субъединиц, определяющие стабильность тетрамерного комплекса L-аспарагиназы.

Практическая значимость исследования

Результаты, полученные в работе, могут служить основой для разработки модифицированных форм L-аспарагиназ. С одной стороны, тетрамеры модифицированных L-аспарагиназ могут быть более устойчивыми в плазме крови человека, что означает пролонгированное действие препарата, и, как следствие, позволяет снижать его лечебные дозы, вводимые пациентам. С другой стороны, разработка новых препаратов L-аспарагиназ может идти по пути снижения молекулярного веса активной формы этого белка, т.е. за счет получения активных димеров, не агрегирующих в комплексы более высокого порядка, что значительно снизит иммунную реакцию организма пациента.

Разработанная методика иммобилизации и мониторинга процессов диссоциации и олигомеризации бактериальных L-аспарагиназ в дальнейшем может быть успешно использована в работах с другими олигомерными белками.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были доложены на международной школе-конференции молодых ученых «Системная биология и биоинженерия» (Москва, 2005), на V Международной конференции «Bioinformatics of genome regulation and structure» (Новосибирск, 2006), на научной конференции ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН (Москва, 2007). По материалам диссертации опубликовано 3 статьи.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, 4-х глав обзора литературы, главы «Материалы и методы», 11-и глав раздела «Результаты и их обсуждение», выводов и списка цитируемой литературы, включающего 202 источника. Работа изложена на 113 страницах текста, содержит 31 рисунок и 20 таблиц.

Исследование выполнено на базе ГУ НИИ БМХ РАМН при финансовой поддержке РФФИ (гранты 04-04-49085 и 07-04-00575).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная часть

Реагенты.

1) Следующие растворы и реагенты были получены от Biacore (Швеция):

- HBS-буфер (150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% сурфактанта P20, 10 мМ HEPES, pH 7,4);

- 10 мМ ацетатный буфер, pH 4,5;

- 10 мМ глицин-HCl, pH 2,5;

- набор реагентов для ковалентной иммобилизации лигандов за первичные аминокислоты: EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид), NHS (N-гидроксисукцинимид), этаноламин-HCl.

2) L-аспарагиназы *Erw. carotovora*, *H. pylori J99* и *H. pylori 26695* (чистоты препаратов более 95 %), любезно предоставленные к.б.н. Красоткиной Ю.В. (ГУ НИИ БМХ РАМН, Москва).

3) L-аспарагиназа *E. coli* (Medac, Германия).

4) L-аспарагиназа *Erw. chrysanthemi* (Sigma).

Эксперименты по изучению процесса олигомеризации L-аспарагиназы *Erw. carotovora*.

Эксперименты были выполнены на оптическом биосенсоре Biacore 3000 (Biacore, Швеция), использующем эффект поверхностного плазмонного резонанса для регистрации межмолекулярных взаимодействий (Myszka D.G. *et al.*, 1997; Jonsson U. *et al.*, 1991). В работе использовали стандартные оптические чипы CM5 с карбоксиметилдекстрановым покрытием.

Иммобилизация L-аспарагиназы *Erw. carotovora* на поверхности оптического чипа CM5.

Карбоксиметилированный 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 была выполнена иммобилизация L-аспарагиназы. Иммобилизация проходила по боковым аминокислотным остаткам лизина и N-концевой аминокислоты, расположенных на поверхности (рис. 1), 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. Далее через измерительную кювету пропускался раствор этаноламина (1 М) для инактивации непрореагировавших эфирных групп на поверхности чипа. После иммобилизации L-аспарагиназы пропускание через измерительную кювету рабочего буфера (HBS-буфер) приводит к постепенному снижению уровня сигнала биосенсора. Возможной причиной этого снижения может быть диссоциация иммобилизованных тетрамеров белка. Если в процессе диссоциации тетрамеров L-аспарагиназы приостановить ток рабочего буфера, наблюдается

остановка дрейфа сигнала, что может быть обусловлено быстрым установлением равновесия (тетрамер↔димер↔мономер), сильно смещенным в сторону тетрамеров. При возобновлении тока буфера распад продолжается с уровня сигнала на момент остановки. Поэтому на оптическом чипе иммобилизуются преимущественно тетрамеры белка. Далее карбоксильные группы декстрана, активированные EDC/NHS, но не прореагировавшие с L-аспарагиназой, были блокированы 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 1.

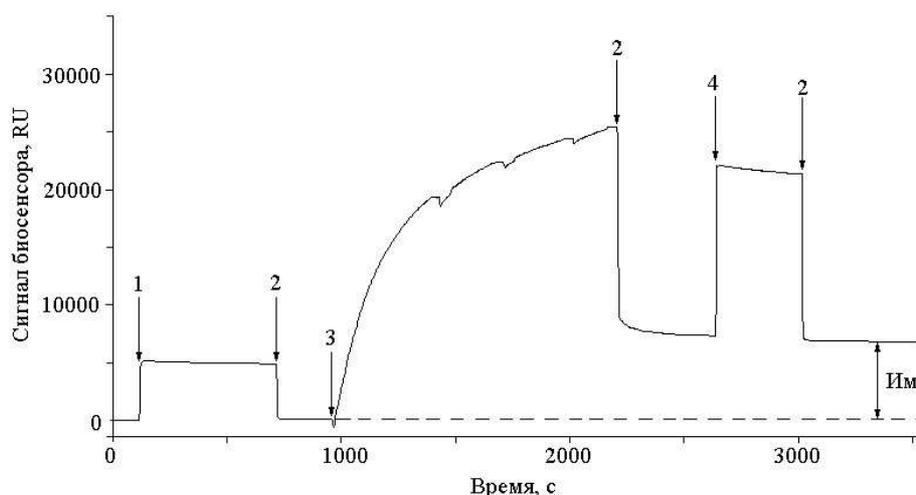


Рисунок 1. Схема иммобилизации L-аспарагиназы *Erw. carotovora* на карбоксиметилдекстрановой поверхности чипа CM5. Стрелками обозначены следующие добавки: 1 - 0,2 М EDC / 0,05 М NHS, 2 - HBS-буфер, 3 - раствор L-аспарагиназы (5 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере (pH 4,5), 4 - 1 М раствор этаноламина (pH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

Ускорение процесса диссоциации иммобилизованной L-аспарагиназы достигалось за счет пропуска глицинового буфера (pH 2,5).

Олигомеризация L-аспарагиназы, иммобилизованной на поверхности оптического чипа, осуществлялась путем пропуска растворов L-аспарагиназы в иммобилизационном буфере.

Эксперименты по изучению специфичности процесса олигомеризации бактериальных L-аспарагиназ.

Для оценки специфичности процесса олигомеризации бактериальных L-аспарагиназ в разных каналах были иммобилизованы L-аспарагиназы из *E. coli*, *H. pylori* J99 и *H. pylori* 26695. Иммобилизованные L-аспарагиназы диссоциировали на субъединицы, после чего через каналы пропускались растворы следующих L-аспарагиназ:

- L-аспарагиназа из *E. coli* (50 мкг/мл),

- L-аспарагиназа из *H. pylori* J99 (250 мкг/мл),
- L-аспарагиназа из *Erw. chrysanthemi* (50 мкг/мл),
- L-аспарагиназа из *H. pylori* 26695 (250 мкг/мл).

Биоинформационная часть

Исходные данные для молекулярного моделирования.

- Аминокислотные последовательности L-аспарагиназ *Erw. carotovora* (Q6Q4F4), *H. pylori* J99 (Q9ZLB9) и *H. pylori* 26695 (O25424) были взяты на протеомном сервере ExPASy (Kotzia G.A. *et al.*, 2005; Bell K.S. *et al.*, 2004; Arweiler R. *et al.*, 2004).

- Аминокислотные последовательности L-аспарагиназ с известными кристаллическими структурами 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) (Berman H.M. *et al.*, 2000) (PDB индексы: 3ECA (Swain A.L. *et al.*, 1993), 1WSA (Lubkowski J. *et al.*, 1996), 4PGA (Jakob C.G. *et al.*, 1997), 1O7J (Lubkowski J. *et al.*, 2003), 1ZCF (Кислицын Ю.А. и др., 2006)).

- Трехмерные координаты кристаллических структур L-аспарагиназ *Erw. chrysanthemi*, *W. succinogenes*, *E. coli* были получены из банка данных PDB (PDB индексы: 1O7J (Lubkowski J. *et al.*, 2003), 1HG1 (Aghaiypour K. *et al.*, 2001), 1HFW (Aghaiypour K. *et al.*, 2001), 1HG0 (Aghaiypour K. *et al.*, 2001), 1HFJ (Jaskolski M. *et al.*, 2001), 1HFK (Jaskolski M. *et al.*, 2001), 3ECA (Swain A.L. *et al.*, 1993), 1WSA (Lubkowski J. *et al.*, 1996)).

Использованное программное обеспечение.

- Сигнальный участок в аминокислотной последовательности фермента был определен с помощью программы SignalP 3.0 Server (Bendtsen J.D. *et al.*, 2004).

- Множественное выравнивание последовательностей L-аспарагиназ 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 (Higgins D. *et al.*, 1994).

- С целью определения аминокислотных остатков, образующих интерфейс между субъединицами в тетрамере L-аспарагиназы и выявления среди них значимых был выполнен анализ зоны контакта между мономерами с помощью виртуального аланинового сканирования на сервере Robetta (Kortemme T. *et al.*, 2004). Для этого каждый аминокислотный остаток поочередно заменяли на аланин и оценивали изменение энергии взаимодействия между субъединицами в результате замены по уравнению, приведенному в общем виде (Kortemme T. *et al.*, 2004):

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

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

Моделирования трехмерной структуры L-аспарагиназ *Erw. carotovora*, *H. pylori* J99 и *H. pylori* 26695.

Для этого с помощью программы SignalP 3.0 Server был выполнен анализ последовательностей данных L-аспарагиназ, полученных с протеомного сервера ExPASy, после чего установленный сигнальный фрагмент был удален. Далее с помощью множественного выравнивания аминокислотных последовательностей был выполнен поиск ближайших гомологов среди L-аспарагиназ с известной трехмерной структурой. Выбранные для моделирования гомологи и аминокислотные последовательности моделируемых L-аспарагиназ использовались в программе Composer. В белках программой определялись области близкие между собой по аминокислотной последовательности, которые позднее укладывались по аналогии с гомологичными структурами. Для негомологичных фрагментов в последовательности моделируемого белка выполнялся поиск гомологичных структур по базе программы. Далее полученный мономер оптимизировался путем минимизации свободной энергии. В результате четыре копии построенного в Composer мономера L-аспарагиназы совмещались с соответствующими мономерами в гомологичной L-аспарагиназе.

Оптимизация молекулярных моделей и моделирование молекулярной динамики структуры L-аспарагиназы.

Минимизация энергии моделей L-аспарагиназы была выполнена по методу Powell с максимальным числом итераций 600. Моделирование молекулярной динамики трехмерных моделей L-аспарагиназ было выполнено в вакууме при постоянной температуре 300°K с продолжительностью 20 пс и шагом 1 фс.

Оценка энергии межсубъединичного взаимодействия.

Энергию взаимодействия между мономерами и димерами вычисляли по формуле:

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

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

Моделирование химерных тетрамеров L-аспарагиназы.

Модели химерных тетрамеров были получены в результате замены субъединицы А на соответствующую субъединицу L-аспарагиназы другого вида.

- Валидация полученных моделей была выполнена с помощью карт Рамачандрана, построенных в программе PROCHECK 3.4.4 (Laskowski R.A. *et al.*, 1993) и сравнительного анализа структур L-аспарагиназ с помощью программы LGA (ver. 03/2003) на сайте Protein Structure Prediction Center (Zemla A., 2003).

- С помощью программного пакета Amber 7 с использованием поля сил Amber выполнялась оптимизация моделей химерных тетрамеров L-аспарагиназ (Case D.A. *et al.*, 2004). Для этого в программе LEaP подготавливались файлы координат и топологии для всех оптимизируемых структур. Далее в программе SANDER для химерных тетрамеров выполнялись минимизация энергии и моделирование молекулярной динамики в водном боксе при постоянном объеме и температуре 300 °К с продолжительностью 20000 фс и шагом 50 фс.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Иммобилизация L-аспарагиназы из *Erw. carotovora* и мониторинг процессов ее диссоциации и олигомеризации.

L-аспарагиназа из *Erw. carotovora* была иммобилизована в одном из каналов оптического биосенсора по методике, описанной в разделе «Материалы и методы». В качестве контроля использовался канал с декстраном без иммобилизованного белка. После иммобилизации L-аспарагиназы наблюдался процесс распада тетрамеров фермента при длительном пропускании HBS-буфера через измерительную кювету (рис. 2). Через несколько дней уровень сигнала биосенсора снизился примерно в 4 раза. Если учесть, что в препаратах L-аспарагиназы отсутствуют примеси протеолитических ферментов, можно предположить, что четырехкратное снижение уровня сигнала прибора свидетельствует о распаде тетрамеров до мономеров. При пропускании 10 мМ раствора глицин-HCl (pH 2,5) скорость снижения сигнала резко возрастала, что указывает на увеличение интенсивности распада тетрамеров, что связано со снижением устойчивости олигомерного состояния L-аспарагиназы при данном значении pH (Sidney Shifrin *et al.*, 1974). Восстановление тетрамеров L-аспарагиназы на поверхности оптического чипа осуществлялось путем пропускания раствора L-аспарагиназы в иммобилизационном буфере (10 мМ ацетатный буфер, pH 4,5), что приводило к резкому повышению концентрации белка на поверхности чипа за счет электростатического притяжения 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. 3). Эксперименты по разрушению тетрамеров L-аспарагиназы до мономеров с последующим их восстановлением удавалось многократно повторять на одном оптическом чипе.

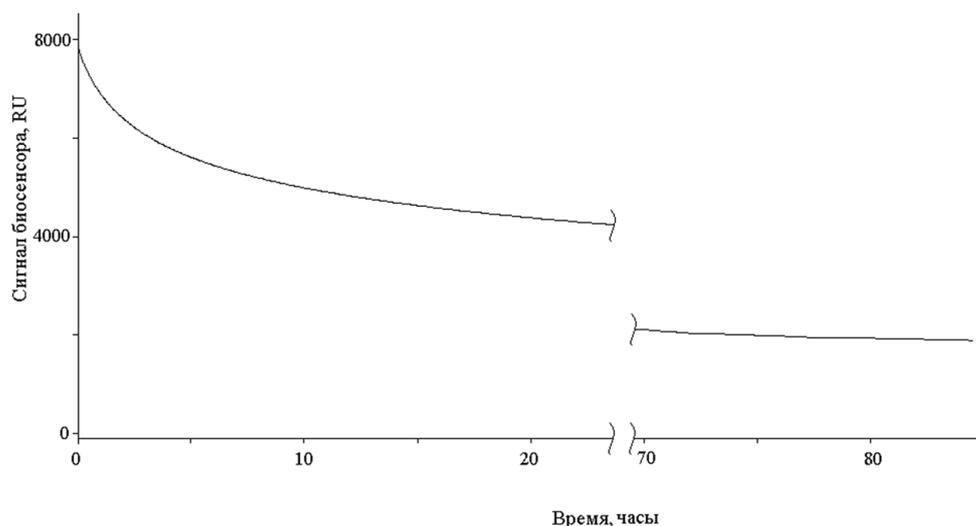


Рисунок 2. Самопроизвольный распад тетрамеров L-аспарагиназы при пропускании HBS-буфера (скорость потока 1 мкл/мин).

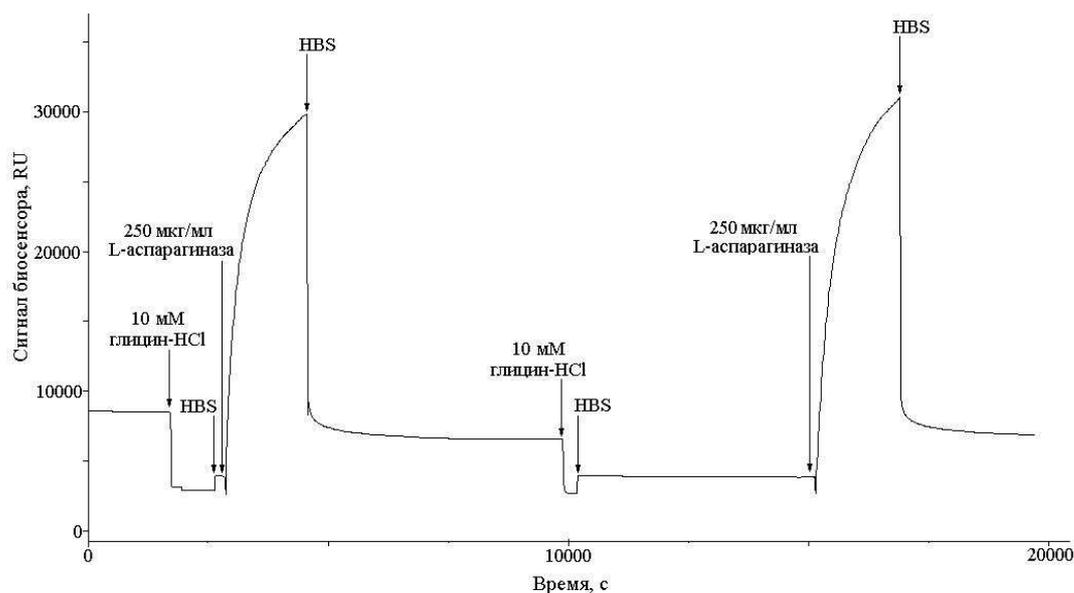


Рисунок 3. Распад тетрамеров L-аспарагиназы при пропускании 10 мМ раствора глицин-HCl (pH 2,5) (скорость потока 1 мкл/мин) и последующая олигомеризация фермента при пропускании раствора L-аспарагиназы в 10 мМ ацетатном буфере (pH 4,5) (скорость потока 1 мкл/мин).

Моделирование L-аспарагиназы из *Erw. carotovora*.

Для того чтобы оценить ориентацию тетрамеров L-аспарагиназы на поверхности оптического чипа и характер связывания с карбоксиметилированным декстраном, необходимо было предварительно проанализировать поверхность белка на возможные места связывания. Однако на момент выполнения работы кристаллическая структура L-аспарагиназы из *Erw. carotovora* еще была неизвестна (кристаллографические данные с разрешением 3 Å для структуры L-аспарагиназы из *Erw. carotovora* были опубликованы в PDB только 18.04.06, PDB индекс 1ZCF (Кислицын Ю.А. и др., 2006)), поэтому первоочередной задачей было создание компьютерных трехмерных моделей мономера и тетрамера данного фермента.

Моделирование пространственной структуры L-аспарагиназы из *Erw. carotovora* и ее оптимизация были выполнены по методике, описанной в разделе материалы и методы. Было установлено, что ближайшим гомологом L-аспарагиназы из *Erw. carotovora* является L-аспарагиназа из *Erw. chrysanthemi*. Оптимизированная модель тетрамера L-аспарагиназы *Erw. carotovora* представлена на рисунке 4.

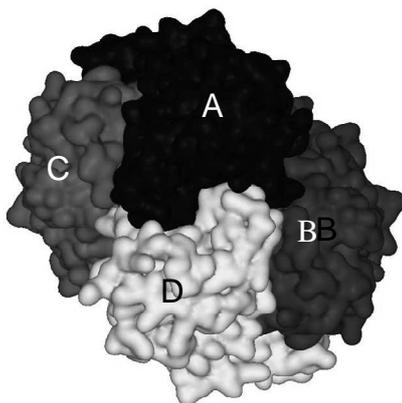


Рисунок 4. Схематичное изображение мономера L-аспарагиназы (а) и тетрамера (б) L-аспарагиназы (субъединицы обозначены А, В, С, D и отображены разными оттенками серого).

Валидация полученных моделей L-аспарагиназ

Адекватность полученной виртуальной модели L-аспарагиназы из *Erw. carotovora* была проверена путем построения и анализа карт Рамачандрана (рис. 5) в программе ProCheck и с помощью сравнительного анализа в программе LGA (табл. 2). Результаты программы ProCheck представлены в таблице 1. Карты Рамачандрана были построены для каждой субъединицы фермента. В виду идентичности полученных карт для всех четырех субъединиц на рисунке 5 приведена карта Рамачандрана для субъединицы А. На картах для L-аспарагиназ из *Erw. carotovora* и *Erw. chrysanthemi* значения углов всех аминокислотных остатков укладываются в допустимых зонах, исключением является треонин 204. Однако это

исключение имеет место в обеих L-аспарагиназах. Остаток треонина 204 для бактериальных L-аспарагиназ является консервативным. Более того, такая аномальная конформация этого остатка присутствует и в других бактериальных L-аспарагиназах (Swain A.L. *et al.*, 1993; Lubkowski J. *et al.*, 1994a; 1994b; 1996; 2003). Треонин 204 расположен в самом начале линкерного участка, соединяющего между собой С-концевой и N-концевой домены. Данная область белка характеризуется высокой подвижностью в сравнении с доменной частью. Тем не менее, отклонения в значениях атомных координат для самого треонина 204 и его ближайшего окружения между мономерами не превышает 0,15 Å, что подтверждает консервативность данного участка бактериальных L-аспарагиназ. Треонин 204 находясь лишь только в такой конформации, способен образовывать 5 водородных связей, подобная стабилизация может энергетически компенсировать стерически невыгодную ориентацию треонина 204 (Lubkowski J. *et al.*, 2003).

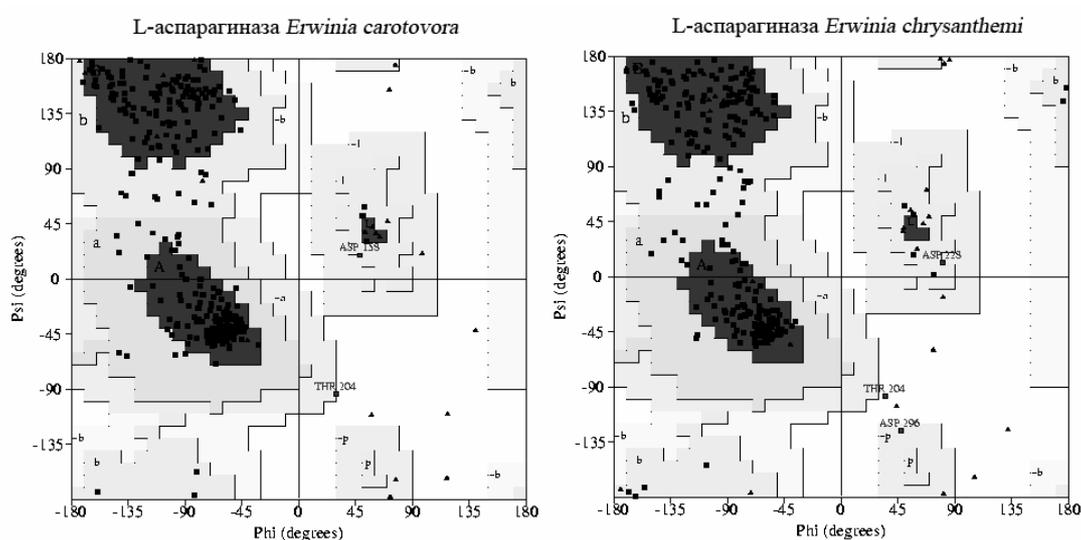


Рисунок 5. Карты Рамачандрана для L-аспарагиназы *Erw. carotovora* (слева) и *Erw. chrysanthemi* (справа). Пространство карты разбито на четыре основные зоны: предпочитаемая (темно-серая), разрешенная (серая), допустимая (светло-серая) и запрещенная (белая).

Таблица 1. Результаты анализа структуры L-аспарагиназ из *Erw. carotovora* и *Erw. chrysanthemi*, выполненного в программе ProCheck

Зоны карты Рамачандрана	Предпочитаемая	Разрешенная	Допустимая	Запрещенная
L-аспарагиназа из <i>Erw. carotovora</i>	86,7%	12,6%	0,4%	0,4%
L-аспарагиназа из <i>Erw. chrysanthemi</i>	83,2%	15,8%	0,7%	0,4%

Поскольку позднее в белковом банке данных PDB появилась кристаллическая структура L-аспарагиназы из *Erw. carotovora* (PDB индекс: 1ZCF (Кислицын Ю.А. и др., 2006)), представлялось актуальным сравнение построенной компьютерной модели L-аспарагиназы из *Erw. carotovora* с ее кристаллической структурой. Величина RMSD и

значения попарных расстояний между C α атомами в мономерах при наложении одной структуры на другую представлены на рисунке 6. Полученные результаты указывают на достоверное предсказание трехмерной структуры L-аспарагиназы из *Erw. carotovora*, что обусловлено высокой степенью гомологии с белком-образцом (L-аспарагиназа из *Erw. chrysanthemi*). Таким образом, использование компьютерного моделирования по гомологии является целесообразным при отсутствии трехмерных структур L-аспарагиназ.

Таблица 2. Сравнительный анализ структур L-аспарагиназы из *Erw. carotovora* и *Erw. 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. Все параметры программы приняты по умолчанию. N1 – количество остатков аминокислот L-аспарагиназы из *Erw. carotovora*; N2 – количество остатков аминокислот L-аспарагиназы из *Erw. chrysanthemi*; DIST – порог отсечения; N – количество совпадающих аминокислот при заданном пороге отсечения; RMSD – среднеквадратичное отклонение, рассчитанное для совпадающих аминокислот; Seq_Id – показатель гомологичности между собой аминокислотных последовательностей; LGA_S – оценка пространственного соответствия структур L-аспарагиназы из *Erw. carotovora* и L-аспарагиназы из *Erw. chrysanthemi* с учетом числа аминокислотных остатков в последней; LGA_Q – качественная оценка, рассчитанная по формуле: $Q=0,1 \cdot N / (0,1 + RMSD)$.

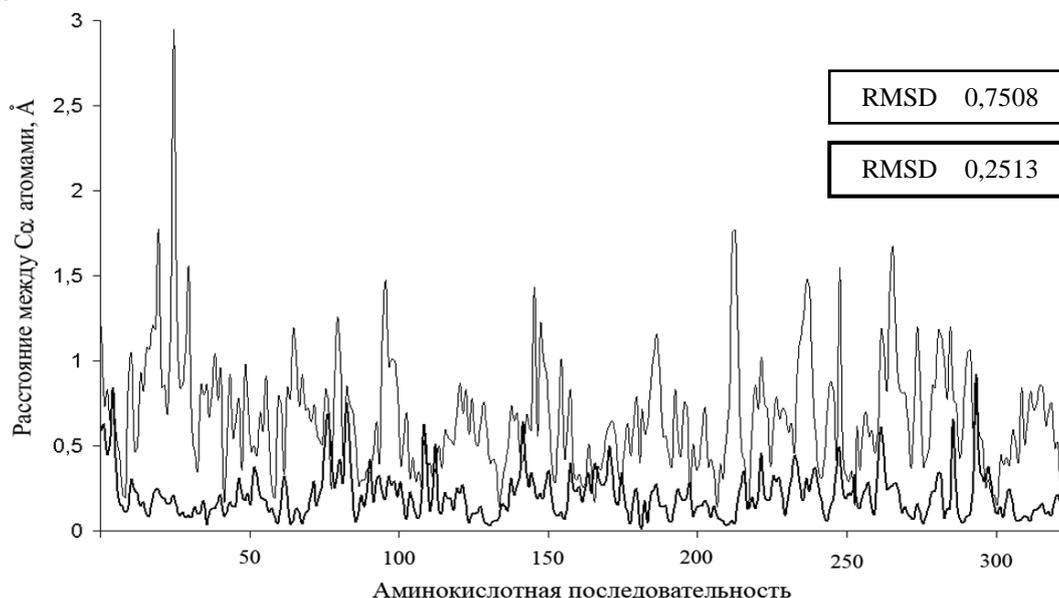


Рисунок 6. Оценка попарных расстояний между C α атомами в субъединице A у компьютерной модели и кристаллической структуры L-аспарагиназы из *Erw. carotovora* (жирная линия); кристаллических структур L-аспарагиназ из *Erw. carotovora* и *Erw. chrysanthemi* (тонкая линия).

Анализ поверхности для предсказания ориентации тетрамеров фермента на поверхности чипа.

Структурно-графический анализ поверхности белка и визуальная оценка позволили определить наиболее доступные аминогруппы для связывания с карбоксиметилированным

декстраном. NH₂-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.

Оценка энергии взаимодействия между димерами AC и BD, а также между субъединицами в этих димерах (*Erw. chrysanthemi* и *Erw. carotovora*).

С целью выявления важных элементов для олигомеризации бактериальных L-аспарагиназ был выполнен структурно-графический анализ полученной модели L-аспарагиназы из *Erw. carotovora* и кристаллической структуры L-аспарагиназы из *Erw. chrysanthemi*. Главным образом внимание уделялось интерфейсу между димерами AC и BD в тетрамерах этих L-аспарагиназ и между мономерами в этих димерах.

Для выявления типа межмолекулярных взаимодействий, вклад которых в устойчивость тетрамерного комплекса бактериальных L-аспарагиназ превалирует, была выполнена оценка энергии межсубъединичных взаимодействий между димерами AC и BD и соответствующими мономерами A и C, B и D. В таблице 3 показаны результаты оценки вклада различных видов межсубъединичного взаимодействия в общую энергию взаимодействия между димерами AC и BD и мономерами в этих димерах для L-аспарагиназ из *Erw. carotovora* и *Erw. chrysanthemi*. Для этого были оценены значения общей энергии, энергии Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий и энергии электростатических взаимодействий тетрамера каждой L-аспарагиназы, а также значения соответствующих видов энергий для димеров AC и BD. После чего по формуле, приведенной в разделе «Материалы и методы», были рассчитаны величины энергетических вкладов различных видов межмолекулярного взаимодействия в образование тетрамера L-аспарагиназы (табл. 3). Таким же образом были оценены значение общей энергии взаимодействия между мономерами, образующими димеры AC и BD, а также вклады электростатических и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий между этими мономерами в общую энергию их взаимодействия (табл. 3).

Таблица 3. Оценка значений энергии различных видов межмолекулярных взаимодействий между субъединицами и димерами в L-аспарагиназе.

	<i>Erw. chrysanthemi</i>			<i>Erw. carotovora</i>		
	AC_BD	A_C	B_D	AC_BD	A_C	B_D
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.

Определение аминокислотных остатков, образующих интерфейс между димерами AC и BD в тетрамере L-аспарагиназы *Erw. carotovora*.

Для оценки вклада различных аминокислот, формирующих область контакта между двумя димерами AC и BD в L-аспарагиназе из *Erw. carotovora*, было выполнено виртуальное аланиновое сканирование данного интерфейса. В результате анализа были установлены аминокислотные остатки, формирующие интерфейс между димерами AC и BD и выявлены среди них значимые путем отбора по значению энергетического эффекта, вносимого ими в процесс комплексообразования. За значимые авторы программы рекомендуют принимать аминокислотные остатки, ΔE_{ABCD} для которых больше 1 ккал/моль (Kortemme T. *et al.*, 2004). Как было установлено контактную область между димерами AC и BD образует примерно по 41 аминокислотному остатку от каждой субъединицы. Результаты виртуального аланинового сканирования показали, что в каждой субъединице в области контакта между димерами примерно 13 аминокислотных остатков играют ключевую роль во взаимодействии между димерами AC и BD, большинство из которых относится к остаткам заряженного типа: аргинин (R122, R159, R198), аспартат (D158, D175) и глутамат (E181, E182). Эти заряженные аминокислотные остатки в интерфейсе между димерами образуют около 8 солевых мостиков, тем самым, обеспечивая высокую стабильность тетрамера L-аспарагиназы. Таким образом, результаты виртуального аланинового сканирования показали, что в тетрамере L-аспарагиназы из *Erw. carotovora* между димерами AC и BD преобладает электростатическое взаимодействие, что согласуется с данными, приведенными в таблице 3. Дополнительно для стабилизации тетрамера в контактной области между димерами AC и BD может образовываться около 67 водородных связей.

Результаты, полученные в экспериментах по изучению олигомеризации L-аспарагиназы из *Erw. carotovora*, подтверждают сделанное заключение, что наибольший вклад в стабилизацию тетрамерного комплекса L-аспарагиназы из *Erw. carotovora* вносят электростатические взаимодействия типа «солевой мостик», а также водородные связи, образованные в контактной области между димерами AC и BD. В условиях низких значений pH наблюдается быстрая диссоциация тетрамеров L-аспарагиназы на субъединицы, что связано с протонированием отрицательно заряженных групп в области контакта между субъединицами и нарушением водородных связей. Быстрый распад тетрамеров L-аспарагиназы наблюдается также в диапазоне высоких значений pH, что согласуется с литературными данными (Cammack K.A. *et al.*, 1972).

Экспериментальная оценка специфичности процесса олигомеризации бактериальных L-аспарагиназ.

Учитывая выше сказанное, а именно присутствие солевых мостиков в интерфейсе между димерами AC и BD, разумно было бы предположить обязательное наличие электростатической комплементарности между этими димерами. Из чего следует, что даже небольшие смещения в расположении аминокислотных остатков интерфейса, участвующих в образовании солевых мостиков, может приводить к нарушению последних и как результат к снижению общей устойчивости тетрамеров L-аспарагиназы. Таким образом, было интересно оценить специфичность процесса олигомеризации бактериальных L-аспарагиназ. Для этого на оптическом биосенсоре Biacore 3000 были выполнены эксперименты, в ходе которых в разных каналах были иммобилизованы L-аспарагиназы из *E. coli*, *H. pylori* J99 и *H. pylori* 26695. В качестве контроля использовался канал с декстраном без иммобилизованного белка.

Все белки были иммобилизованы по методике, описанной в разделе «Материалы и методы». Диссоциация всех белков осуществлялась путем пропускания глицинового буфера (pH 2,5), согласно методике. Специфичность олигомеризации бактериальных L-аспарагиназ оценивалась по изменению сигнала биосенсора при пропускании растворов L-аспарагиназ разных видов через измерительную кювету с иммобилизованной L-аспарагиназой.

При пропускании растворов бактериальных L-аспарагиназ на поверхности оптического чипа не наблюдается неспецифичного связывания L-аспарагиназ из пропускаемых растворов, о чем свидетельствует отсутствие значительных изменений уровня сигнала биосенсора в контрольном канале.

При пропускании растворов L-аспарагиназ через канал с иммобилизованной L-аспарагиназой из *E. coli* было зарегистрировано повышение сигнала оптического биосенсора на 5000 RU для раствора самой L-аспарагиназы из *E. coli*. Во всех остальных случаях уровень сигнала оставался без существенных изменений, что говорит о высокой избирательности L-аспарагиназы из *E. coli* в процессе ее олигомеризации (рис. 7). В тоже время это подтверждает предположение сделанное выше, что снижение уровня сигнала биосенсора при пропускании HBS-буфера или глицин-HCl буфера после иммобилизации L-аспарагиназы связано с диссоциацией L-аспарагиназы на субъединицы.

При пропускании растворов L-аспарагиназ через канал с иммобилизованной L-аспарагиназой из *H. pylori* J99 также наблюдалось повышение сигнала биосенсора, однако в данном случае связывание было зарегистрировано для двух растворов L-аспарагиназ (рис. 8). При пропускании раствора L-аспарагиназы из *H. pylori* J99 наблюдалось повышение сигнала биосенсора примерно на 5500 RU. Немного меньше примерно на 4500 RU было зарегистрировано увеличение уровня сигнала при пропускании раствора L-аспарагиназы из

H. pylori 26695. Это легко можно объяснить, если учесть, что гомология между двумя этими белками составляет 93%, и области межсубъединичного интерфейса, обеспечивающие узнавание других партнеров олигомеризации, высоко консервативны для этих L-аспарагиназ.

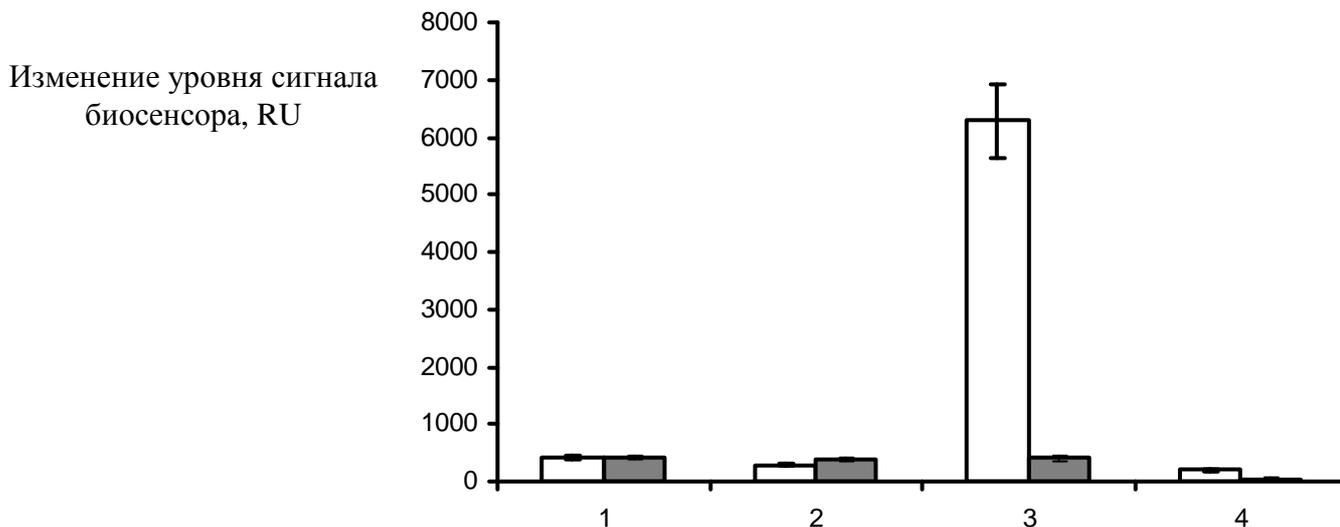


Рисунок 7. Регистрация связывания L-аспарагиназ из пропускаемых растворов на поверхности чипа в канале с иммобилизованной L-аспарагиназой из *E. coli*. Столбцы контроля окрашены в серый цвет. Номерами обозначены: L-аспарагиназа из *H. pylori* J99 (1), L-аспарагиназа из *H. pylori* 26695 (2), L-аспарагиназа из *E. coli* (3), L-аспарагиназа из *Erw. chrysanthemi* (4).

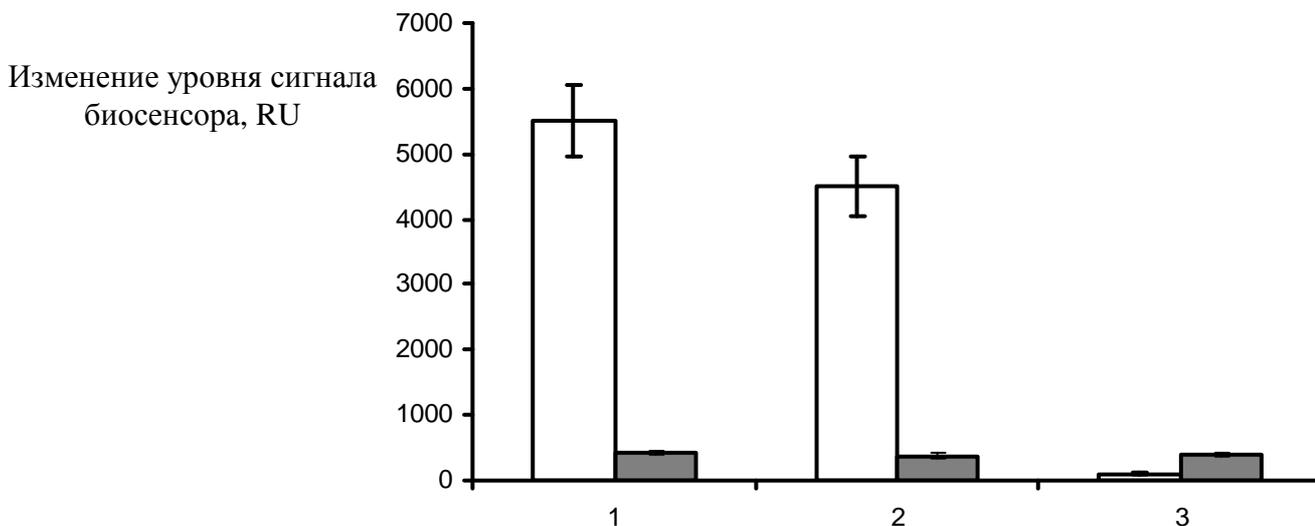


Рисунок 8. Регистрация связывания L-аспарагиназ из пропускаемых растворов на поверхности чипа в канале с иммобилизованной L-аспарагиназой из *H. pylori* J99. Столбцы контроля окрашены в серый цвет. Номерами обозначены: L-аспарагиназа из *H. pylori* J99 (1), L-аспарагиназа из *H. pylori* 26695 (2), L-аспарагиназа из *E. coli* (3).

Также, как в случае с иммобилизованной L-аспарагиназой из *H. pylori* J99, при пропускании растворов L-аспарагиназ из *H. pylori* J99 и *H. pylori* 26695 через канал с иммобилизованной L-аспарагиназой из *H. pylori* 26695 было зарегистрировано повышение сигнала оптического биосенсора примерно на 4000 RU и 6000 RU, соответственно (рис. 9).

При пропускании растворов L-аспарагиназы из *E. coli* значительных изменений в уровне сигнала биосенсора не наблюдалось.

По результатам, полученным в ходе эксперимента, можно предположить, что процесс олигомеризации бактериальных L-аспарагиназ высоко специфичен. Взаимодействие между субъединицами разных L-аспарагиназ не приводит к образованию устойчивых комплексов. Лишь L-аспарагиназы высокоомологичные по аминокислотной последовательности, и значимые аминокислотные остатки интерфейса которых высоко консервативны, способны образовывать относительно стабильные химерные комплексы.

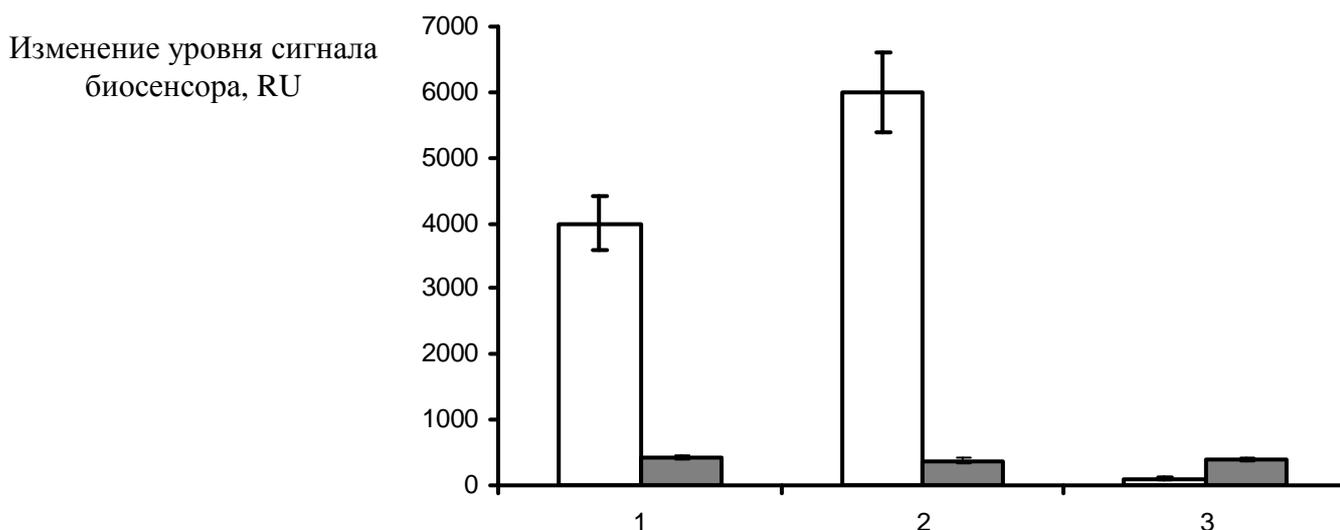


Рисунок 9. Регистрация связывания L-аспарагиназ из пропускаемых растворов на поверхности чипа в канале с иммобилизованной L-аспарагиназой из *H. pylori* 26695. Столбцы контроля окрашены в серый цвет. Номерами обозначены: L-аспарагиназа из *H. pylori* J99 (1), L-аспарагиназа из *H. pylori* 26695 (2), L-аспарагиназа из *E. coli* (3).

Построение трехмерных моделей L-аспарагиназ из *H. pylori* J99 и *H. pylori* 26695 и их оптимизация.

На данный момент в базе PDB отсутствуют кристаллографические данные для L-аспарагиназ из *H. pylori* 26695 и *H. pylori* J99, поэтому были построены модели пространственных структур для этих белков.

Моделирование пространственной структуры L-аспарагиназ из *H. pylori* 26695 и *H. pylori* J99 и их оптимизация были выполнены по методике, описанной в разделе материалы и методы. Было установлено, что ближайшим гомологом L-аспарагиназ из *H. pylori* 26695 и *H. pylori* J99 является L-аспарагиназы из *E. coli* и *W. succinogenes*.

Проверка качества полученных моделей L-аспарагиназ из *H. pylori* 26695 и *H. pylori* J99 была выполнена путем построения и анализа карт Рамачандрана (рис. 10) в программе ProCheck и с помощью сравнительного анализа в программе LGA (табл. 4). Результаты

программы ProCheck представлены в таблице 5. Карты Рамачандрана были построены для каждой субъединицы фермента. В виду идентичности полученных карт для всех четырех субъединиц на рисунке 12 приведены карты Рамачандрана для субъединицы А. На картах для L-аспарагиназ из *E. coli*, *H. pylori 26695* и *H. pylori J99* значения углов почти всех аминокислотных остатков укладываются в допустимых зонах. Однако для L-аспарагиназы из *H. pylori 26695* пять аминокислотных остатков попадают в запрещенную зону, что соответствует 1,4% от общего количества. В случае L-аспарагиназы из *H. pylori J99* на карте Рамачандрана 3 аминокислотных остатка находятся в запрещенной зоне, что составляет 1% от общего количества. В обоих случаях подобные отклонения в структуре считаются допустимыми.

Анализ в программе LGA также показал приемлемое качество моделей. Обычно пространственные структуры в программе имеют оценку LGA_Q больше 2. Модели, для которых $LGA_Q < 2$, имеют значительные структурные отклонения. Для полученных моделей L-аспарагиназ из *H. pylori 26695* и *H. pylori J99* эта оценка имеет значения 92,887 и 96,233, соответственно.

Таблица 4. Сравнительный анализ структур L-аспарагиназ из *H. pylori 26695* и *H. pylori J99* с L-аспарагиназой из *E. coli*

	N1	N2	DIST	N	RMSD	Seq_Id	LGA_S	LGA_Q
L-аспарагиназа из <i>H. pylori 26695</i>	1224	1304	5,0	1176	1,17	48,89	86,049	92,887
L-аспарагиназа из <i>H. pylori J99</i>	1232	1304	5,0	1184	1,13	50,00	86,948	96,233

Примечание. Сравнительный анализ был выполнен с использованием программы LGA. Все параметры программы приняты по умолчанию. N1 – количество остатков аминокислот L-аспарагиназы, для которой выполняется анализ; N2 – количество остатков аминокислот L-аспарагиназы из *E. coli*; DIST – порог отсечения; N – количество совпадающих аминокислот при заданном пороге отсечения; RMSD – среднеквадратичное отклонение, рассчитанное для совпадающих аминокислот; Seq_Id – показатель гомологичности между собой аминокислотных последовательностей; LGA_S – оценка пространственного соответствия структур L-аспарагиназ из *H. pylori J99* и *H. pylori 26695* структуре L-аспарагиназы из *E. coli* с учетом числа аминокислотных остатков в последней; LGA_Q – качественная оценка, рассчитанная по формуле: $Q=0,1 \cdot N / (0,1 + RMSD)$.

Таблица 5. Распределение значений углов в структурах L-аспарагиназ из *H. pylori 26695* и *H. pylori J99* на карте Рамачандрана.

Зоны карты Рамачандрана	Предпочитаемая	Разрешенная	Допустимая	Запрещенная
L-аспарагиназа из <i>H. pylori 26695</i>	77,8%	18,8%	1,7%	1,7%
L-аспарагиназа из <i>H. pylori J99</i>	76,7%	20,5%	1,7%	1,0%

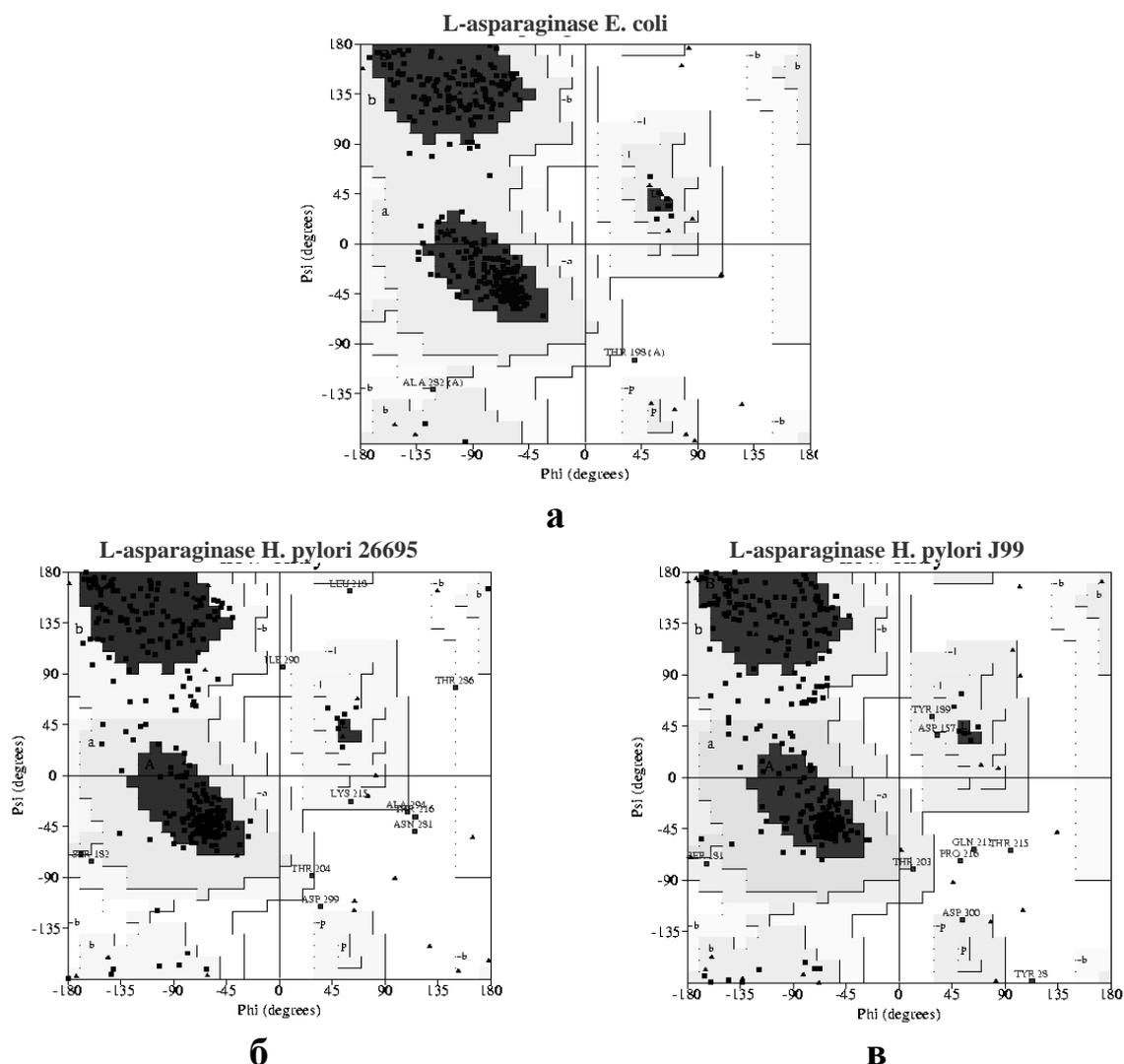


Рисунок 10. Карты Рамачандрана для L-аспарагиназ *E. coli* (а), *H. pylori* 26695 (б) и *H. pylori* J99 (в). Пространство карты разбито на четыре основные зоны: предпочитаемая (темно-серая), разрешенная (серая), допустимая (светло-серая) и запрещенная (белая).

Построение трехмерной модели химерных тетрамеров L-аспарагиназ и их оптимизация.

Чтобы оценить устойчивость химерных тетрамеров L-аспарагиназы, образующихся в эксперименте по изучению специфичности процесса олигомеризации бактериальных L-аспарагиназ, были получены модели этих химерных комплексов. Для этого в каждом из белке заменялась субъединица А из тетрамера одной L-аспарагиназы на соответствующую субъединицу из тетрамера L-аспарагиназы другого вида. Получены были следующие химерные тетрамеры L-аспарагиназ:

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)

Полученные химерные тетрамеры были оптимизированы путем моделирования молекулярной динамики и минимизации энергии. Для оценки устойчивости этих химерных комплексов основное внимание уделялось интерфейсу между субъединицами А и С.

Оценка энергии взаимодействия между субъединицами А и С в моделях химерных тетрамеров.

Значение общей энергии взаимодействия между мономерами А и С были оценено с помощью программного комплекса Sybyl. Для этого были рассчитаны значения общей энергии каждого химерного тетрамера, а также значения общей энергии для мономеров А и С. После чего по формуле, приведенной в разделе «Материалы и методы», были рассчитаны величины энергетических вкладов различных видов межмолекулярного взаимодействия в образование этих химерных тетрамеров (рис. 11).

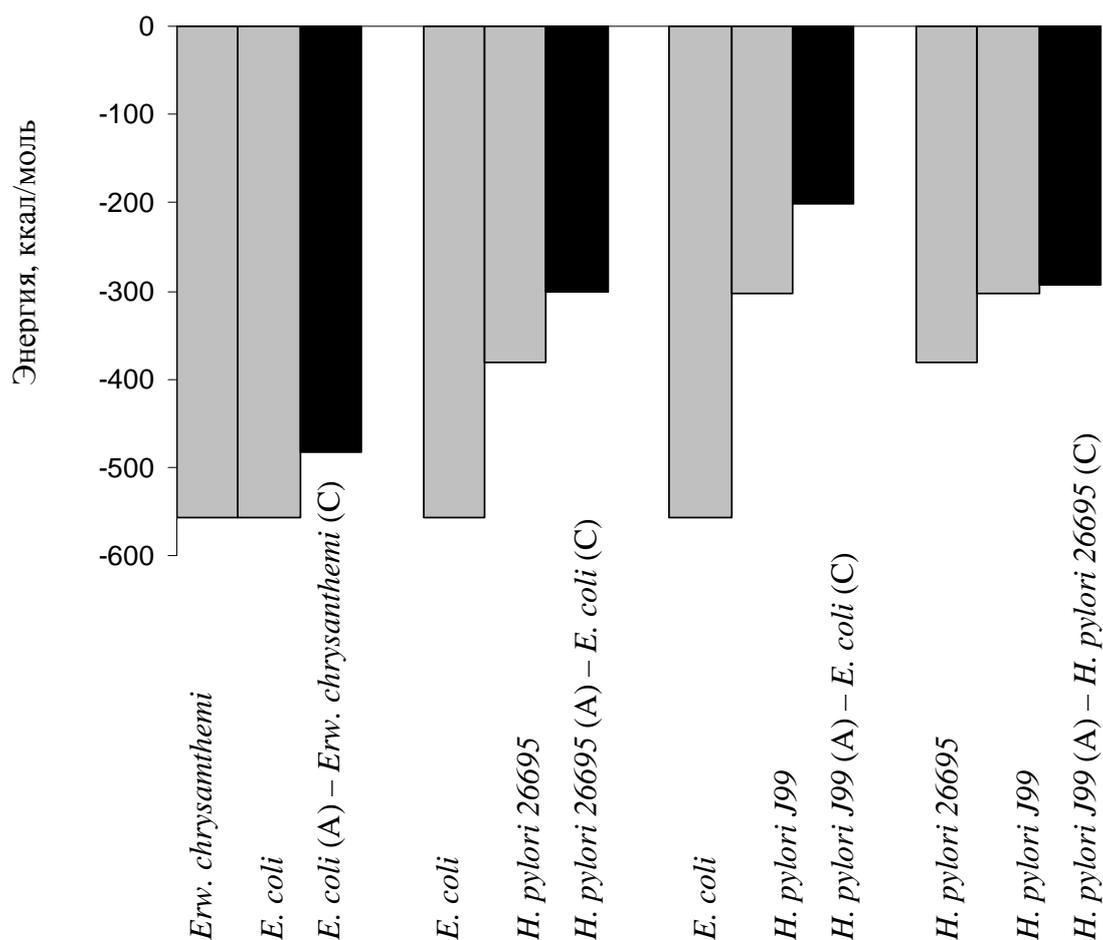


Рисунок 11. Оценка значений энергии взаимодействия между субъединицами в димере АС в химерных тетрамерах L-аспарагиназы (черные столбцы) и в их диких формах (серые столбцы).

Определение аминокислотных остатков, образующих интерфейс между субъединицами А и С в химерных тетрамерах L-аспарагиназ и их диких формах.

Для оценки вклада различных аминокислот, формирующих область контакта между мономером А и мономером С в химерных тетрамерах L-аспарагиназ, было выполнено виртуальное аланиновое сканирование данного интерфейса. В результате анализа были установлены аминокислотные остатки, формирующие интерфейс между мономерами А и С и выявлены среди них значимые путем отбора по значению энергетического эффекта, вносимого ими в процесс комплексообразования. Результаты анализа показали, что при образовании димера АС из субъединиц от разных L-аспарагиназ происходит уменьшение общего числа значимых аминокислотных остатков во взаимодействии между мономерами А и С, а также солевых мостиков, вносящих вклад в устойчивость димера АС (табл. 6). Этот факт позволяет предполагать, что в данном случае происходит снижение стабильности химерных димеров и как следствие химерных тетрамеров относительно “диких” тетрамеров L-аспарагиназы. Если учесть, что активные центры L-аспарагиназы формируются в зоне интерфейса между субъединицами, можно предположить, что в L-аспарагиназах имеет место строго определенное позиционирование субъединиц тетрамера относительно друг друга, поскольку даже небольшие изменения в положении субъединиц могут привести к нарушению активного центра и как следствие к полной потере активности L-аспарагиназы. Поэтому каждый мономер L-аспарагиназы в растворе других белков должен проявлять высокую специфичность по отношению к другим участникам олигомеризации бактериальных L-аспарагиназ.

Таблица 6. Число возможных солевых мостиков в зоне контакта между мономерами А и С.

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

ВЫВОДЫ

1. На примере моделирования трехмерной структуры L-аспарагиназы *Erw. carotovora* показана высокая эффективность моделирования по гомологии структур новых L-аспарагиназ. Построены и оптимизированы модели пространственной структуры L-аспарагиназ из *H. pylori J99* и *H. pylori 26695*.

2. Молекулярно-графический анализ интерфейса между димерами AC и BD в тетрамерном комплексе L-аспарагиназы из *E. carotovora* показал, что высокая прочность комплекса обеспечивается преимущественно электростатическими взаимодействиями типа «солевой мостик». Экспериментально на оптическом биосенсоре была подтверждена высокая прочность тетрамеров данного фермента (константа скорости диссоциации – порядка $6 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$).

3. Методом виртуального аланинового сканирования выявлены ключевые аминокислотные остатки в интерфейсе между димерами AC и BD в тетрамере L-аспарагиназы из *Erw. carotovora*.

4. В экспериментах на оптическом биосенсоре показана высокая специфичность процесса олигомеризации бактериальных L-аспарагиназ. С помощью компьютерного моделирования химерных структур тетрамеров L-аспарагиназ показана низкая устойчивость комплексов, собранных из субъединиц разных бактериальных L-аспарагиназ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Мезенцев Ю.В., Мольнар А.А., Иванов А.С. Олигомеризация L-аспарагиназы из *Erwinia carotovora* // Материалы Международной школы-конференции молодых ученых «Системная биология и биоинженерия». – Москва, 2005. – С. 38-39.
2. Мезенцев Ю.В., Мольнар А.А., Гнеденко О.В., Красоткина Ю.В., Соколов Н.Н., Иванов А.С. Олигомеризация L-аспарагиназы из *Erwinia carotovora* // Биомедицинская химия. – 2006. Т. 52, № 3. – С. 258-271.
- 2а. Mezentsev Yu.V., Molnar A.A., Gnedenko O.V., Krasotkina Yu.V., Sokolov N.N. and Ivanov A.S. Oligomerization of L-Asparaginase from *Erwinia carotovora* // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2007. – V. 1, № 1. – P. 58–67.
3. Ivanov A.S., Gnedenko O.V., Molnar A.A., Mezentsev Yu.V., Lisitsa A.V. and Archakov A.I. Protein–protein interactions as new targets for drug design: virtual and experimental approaches // Proceedings of the fifth international conference on bioinformatics of genome regulation and structure. – Novosibirsk, 2006. – С. 277-281.
4. Ivanov A.S., Gnedenko O.V., Molnar A.A., Mezentsev Yu.V., Lisitsa A.V. and Archakov A.I. Protein–protein interactions as new targets for drug design: virtual and experimental approaches // J. Bioinform. Comput. Biol. – 2007. – V. 5, № 4. – P. 579-592.

Список сокращений

PDB – Protein Data Bank

EDC – 1-этил-3((3-диметиламино)пропил)карбодиимид

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

HEPES – N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-этан сульфоновая кислота

NHS – N-гидроксисукцинимид

LGA – Local-Global Alignment

RMSD – среднеквадратичное отклонение