

СТРАТИФИКАЦИЯ ЦЕНТРОВ ПРИСОЕДИНЕНИЯ ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТА К ФЕРМЕНТУ НА 3D-МОДЕЛИ БЫЧЬЕЙ ТЕСТИКУЛЯРНОЙ ГИАЛУРОНИДАЗЫ И ЭФФЕКТИВНЫЙ РАЗМЕР ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВОЙ ОБОЛОЧКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО БЕЛКА

© 2015 А.В. Максименко*, А.Д. Турашев, Р.Ш. Бибилашвили

Институт экспериментальной кардиологии,
Российский кардиологический научно-производственный комплекс
Минздрава России, 121552 Москва, 3-я Черепковская ул., 15а;
факс: +7(495)414-6699, электронная почта: alexmak@cardio.ru

Поступила в редакцию 21.02.14
После доработки 29.09.14

Используя в качестве прототипа установленную пространственную структуру гиалуронидазы человека, была построена *in silico* методом молекулярного гомологичного моделирования 3D-структура бычьей тестикулярной гиалуронидазы (БТГ). Ее анализ обнаружил наличие стратификации остатков лизина при модификации фермента. Моделируя ковалентное связывание с ними активированных бензохиноном звеньев хондроитинсульфата (ХС), была получена 3D-структура модифицированной ХС БТГ (БТГ–ХС). При этом варьировалась как степень модификации фермента, так и размер ковалентно присоединенных к нему цепей ХС. Показана значимость глубоких степеней модификации БТГ для получения активных и стабильных ферментных производных, установленная ранее экспериментально. Подтвержден эффективный размер ХС-оболочки для продуктивной модификации БТГ. Теоретически он достигается при увеличении молекулярной массы производного БТГ–ХС до 140–180 кДа и может быть практически получен, согласно экспериментальным данным, с использованием ХС разной молекулярной массы (как 30–50, так и 120–140 кДа).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бычья тестикулярная гиалуронидаза, пространственная структура, хондроитинсульфат, модификация остатков лизина, конъюгат гиалуронидаза–хондроитинсульфат, степень модификации, хондроитинсульфатная оболочка.

Взаимосвязь структуры и функции макромолекул предстает одной из тематических детерминант биохимии. Актуальность этого направления увеличилась благодаря стремительному формированию биотехнологии, биоинженерии, биофармакологии. Реально ощутимы результаты практического использования ферментных производных в медицинской области, в частности в кардиологии, онкологии, гастроэнтерологии [1, 2]. Исследовательский интерес стал еще выше с развитием гликобиологии [3]. Так,

первой стадией повреждения сосудистой стенки, обуславливающей развитие сердечно-сосудистых патологий, выступает в большинстве случаев нарушение целостности эндотелиального гликокаликса [4]. В организме регуляторами его состояния помимо биосинтеза *de novo* предстают активные формы кислорода, протеолитические и гликозидазные ферменты [5, 6]. Последние определяют *in vivo* катаболизм гликозаминогликановой части эндотелиального гликокаликса и экстрацеллюлярного матрикса. Среди ферментов гликозидазной группы можно выделить гиалуронидазы [7], ответственные за метаболизм гиалуронана – одного из основных компонентов эндотелиального гликокаликса (лимитирующего его проницаемость [8, 9]) и важного структурного элемента раковых опухолей [10, 11]. Бычья тестикулярная гиалуронидаза (БТГ, ЕС 3.2.1.35) является коммерчески доступным медицинским препаратом, разрешенным в России для внутримышечных/подкож-

Принятые сокращения: 3D – пространственная/трехмерная/третичная структура белка; БТГ – бычья тестикулярная гиалуронидаза; ТНБС – тринитробензосульфоновая кислота; ХС – хондроитинсульфат; GCU – глюконовая кислота; NAG – N-ацетилглюкозамин; RMS – величина среднеквадратичного отклонения C_α-атомов модели от положения C_α-атомов прототипа; ЭФР – эпидермальный фактор роста; а.о. – аминокислотные остатки.

* Адресат для корреспонденции.

ных инъекций и местного применения, и становится значимым объектом гликобиологических исследований [12]. Стремительность их развития продемонстрировала как внятные успехи этого направления, так и затруднения его роста. Исследовательские трудности связаны с малой изученностью гиалуронидаз позвоночных, их невысокой, а то и крайне низкой концентрацией в организме (~60 нг/мл) и заметным недостатком структурной информации [13]. Вместе с тем современное развитие приемов вычислительной химии *in silico*, появление кристаллических структур гиалуронидазы пчел [14] и человека [15] способствует преодолению отмеченных затруднений. Кроме того, гиалуронидазы позвоночных, проявляя на порядок более высокую ферментативную активность, чем другие глобулярные биокатализаторы, обнаруживают невысокую стабильность при очистке и выделении [12, 13]. Такое положение четко обосновывает значимость обеспечения доступности этих ферментов для исследовательских целей и разработки на их основе новых стабилизированных производных биокатализаторов. Актуальность получения модифицированных форм гиалуронидазы со стабильной эндогликозидазной активностью для медицинского применения [16, 17], естественно, ассоциируется с важностью изучения молекулярной структуры таких производных для оптимизации их свойств.

Целью нашей работы стало построение трехмерной структуры нативной (БТГ) и модифицированной ХС гиалуронидазы (БТГ–ХС) методами компьютерного моделирования, выявление иерархии ϵ -аминогрупп остатков лизина при модификации фермента ХС и определение эффективных размеров гликозаминогликановой оболочки модифицированного биокатализатора. Теоретически полученные данные были сопоставлены с ранее полученными результатами экспериментального изучения.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Моделирование 3D-структуры БТГ (NP_001-008413.2 sperm adhesion molecule) продукта гена *SPAM1* (sperm adhesion molecule 1 [*Bos taurus*], (PH20, HyalP)) было начато в 2008 г. и осуществлено с использованием трех разных алгоритмов на основе гомологичного моделирования. Использованы три сервера: Лондонского имперского колледжа (Phyre), Лионского центра биоинформатики (Geno3D), Швейцарского центра биоинформатики (Базель) и программа Modeller [18, 19].

Последовательность аминокислот построена по последовательности нуклеотидов структуры

основного варианта мРНК гена *SPAM1* (*Bos taurus*) без учета возможных посттрансляционных модификаций. Зрелый белок согласно литературным данным соответствует последовательности между 36 и 490 аминокислотами. Выравнивание структуры со всеми гомологичными структурами осуществлялось с использованием алгоритма CLUSTALx различными программами в зависимости от использованного сервера. При локальном моделировании использовался пакет «Chimera».

Всего было получено шесть структур, пять похожих друг на друга с RMS менее 12 Å, которые были подвергнуты процедуре оптимизации структуры с использованием силовых полей Amber96, CharMM и Gromos96. Оптимизация всех структур проводилась в условиях вакуума при диэлектрической константе изотропной среды внутри молекулы, равной 4, вовне молекулы – 80 и ионной силе среды 0,1 М. Все остатки лизина и гистидина, экспонированные в растворитель, рассматривались в протонированной форме, а неэкспонированные на поверхность – в незаряженной форме. Результирующие структуры, полученные из всех пяти моделей, были практически одинаковы – RMS менее 2 Å.

Оценка качества произведенного моделирования проведена с использованием алгоритмов и серверов: Procheck [20–22] и WhatCheck/WhatIf Gert Vriend's protein structure analysis & verification tools [23–26]. Полученная структура была проанализирована с помощью программ WhatIf и Procheck. «Надежность» полученной структуры – не ниже, чем качество использованного прототипа. Дополнительная оптимизация нескольких аминокислотных остатков (Asp 37, Phe 38, Lys 160, Asp 385, Glu 257, Thr 422) вполне возможна. Из рассмотрения был исключен C-концевой домен, следующий за доменом, сходным с эпидермальным фактором роста (EGF like), из-за отсутствия в базе данных 3D-структур, гомологичных C-концевому домену БТГ.

Построение 3D-модели структуры БТГ, модифицированной ХС, проводилось с использованием 3D-модели БТГ, полученной нами на основании гомологии с гиалуронидазой человека, пространственная структура которой известна [15]. Моделирование химической модификации БТГ активированным бензохиноном ХС [17] опиралось на исходные экспериментальные данные. Они свидетельствовали, что для модификации БТГ использовали ХС с молекулярной массой 120–140 [17] или 30–50 кДа [27, 28] с неизвестным распределением молекулярных масс. В результате модификации БТГ молекулярная масса модифицированного фермента возросла

до 180 кДа, а степень модификации алифатических аминокетильных групп составляла 82–88% (т.е. такая их доля от исходной была блокирована или маскирована для титрования тринитробензосульфоновой кислотой, ТНБС). Производное БТГ–ХС сохраняет 76–78% (при pH 5,5) и 63–65% (при pH 7,5) первоначальной эндогликозидазной активности [17] и изменяет отклик на взаимодействие с моно-, дисахаридами и короткими фрагментами гликозаминогликанов [27].

Построение 3D-модели БТГ–ХС вели поэтапно. Первоначально достигали постепенного экранирования поверхностных остатков лизина (сначала 2, потом 6, затем 12, 19, 21 соответственно) БТГ тетрамерами (октасахаридами) ХС. Затем эти электростатически связанные с белком фрагменты ХС статистически заполимеризовывали в цепочки ХС, учитывая, что 60 дисахаридных звеньев ориентировочно составляют полимер с массой 30 кДа. Заряды всех сульфогрупп нейтрализовали гидратированным катионом Na^+ (H_2O)₅. Так получали 3D-структуру нековалентного электростатического комплекса БТГ..ХС. Похожим образом строили и 3D-структуру ковалентного производного БТГ–ХС. После электростатического присоединения фрагментов ХС по ε-аминогруппам поверхностных остатков лизина БТГ моделировали их ковалентное связывание посредством бензохиноновой активации, а затем осуществляли статистическую полимеризацию ковалентно присоединенных фрагментов ХС в его цепь. Качество построенных 3D-моделей нековалентного и ковалентного производного БТГ–ХС проверялось тем же набором программ, что и полученная на-

ми ранее 3D-структура БТГ. Обнаружены отклонения от стандартных углов и длин связей вблизи контактных остатков лизина. Искажения 3D-структуры БТГ в электростатическом комплексе БТГ..ХС существенно меньше, чем в ковалентном конъюгате БТГ–ХС. Независимого способа проверки качества расчетов с участием ковалентно модифицированных остатков лизина среди литературных данных пока нет. Экспериментальные данные подтверждали наличие конформационных изменений БТГ при гликировании фермента сахарами [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Построение 3D-модели БТГ. Среди трехмерных структур гиалуронидаз (близких по происхождению к позвоночным) первой методами рентгеновской кристаллографии была определена 3D-структура гиалуронидазы из яда пчел [11]. Используя ее как прототип, были построены 3D-модели БТГ [29, 30] и человеческой гиалуронидазы [7]. Современное рассмотрение прототипов БТГ с установленной 3D-структурой (табл. 1) демонстрирует как оптимальную среди них структуру человеческой гиалуронидазы (Hyal1). Ее кристаллографическое определение [15] обосновывало продуктивность построения *in silico* 3D-модели структуры БТГ (и сходной с ней гиалуронидазы из семенников человека (HyalP)) по прототипу человеческой гиалуронидазы. Наложение (суперпозиция) структур полученной 3D-модели БТГ с известной структурой гиалуронидазы человека (Hyal1) и 3D-мо-

Таблица 1. Прототипы БТГ с установленной 3D-структурой

RCSB PDB ID (длина, а.о.)	Вид структуры прототипа	Сравнение с БТГ	
		идентичные а.о. (а.о. в гомологичной зоне, %)	аналогичные а.о.
2pe4 (424)	структура гиалуронидазы человека 1 (Hyal1), фермент, гидролизующий гиалуронан и вовлеченный в опухолевый рост и ангиогенез	416/424 (98)	8/424
2atm (331)	кристаллическая структура рекомбинантного аллергена ves v2 (гиалуроноглюкоамидазы)	103/331 (31)	228/331
1fcu (350)	кристаллическая структура тригональной гиалуронидазы из яда пчел	102/350 (29)	248/350
1feqa (321)	гиалуронидаза из яда пчел	48/321 (15)	273/321
2j88 (349)	гиалуронидаза из яда пчел	100/349 (28)	247/349

Примечание. RCSB PDB ID – обозначение структуры в белковой базе данных (www.rcsb.org).

дели Hya1P обнаружило их заметное сходство (рис. 1, *a*; см. цветную вклейку). При этом проявились определенные отличия от структуры гиалуронидазы яда пчел. Они связаны, в первую очередь, с наличием в молекуле гиалуронидазы человека C-концевого домена (Ser 353–Trp 435), гомологичного эпидермальному фактору роста (ЭФР) [15], его присутствием в построенной нами 3D-модели БТГ (справа на рис. 1, *a*) и отсутствием в составе пространственной структуры гиалуронидазы из яда пчел (рис. 1, *a*, синий цвет). Считают, что домен ЭФР достаточно стабилен, будучи «прошит» тремя дисульфидными связями, и может осуществлять регуляторную роль при связывании с другими белками и модулировать активность полноразмерной формы фермента [15]. С доменом ЭФР близко ассоциирован N-концевой каталитический домен гиалуронидазы человека (Phe 22–Thr 552) и БТГ (слева на рис. 1, *a*). Содержание элементов вторичной структуры в названных выше 3D-структурах гиалуронидаз и 3D-модели БТГ приведено в табл. 2. Заметно сходство топологии 3D-структур гиалуронидазы человека [15] и БТГ, что свидетельствует об отсутствии помех построения 3D-модели БТГ, похожей на пространственную структуру человеческой гиалуронидазы Hya11.

Гиалуронидазы млекопитающих проявляют 30–40%-ную консервативность аминокислотных последовательностей в области активного центра биокатализатора [15, 30]. Сайтнаправленным мутагенезом была установлена непреложная важность для катализа гиалуронидазой человека остатков Glu 131 и Asp 129 (нумерация по Hya11), а также Tyr 247 и Tyr 202 (последний предстает детерминантой субстратного связывания) [7, 31]. Область активного центра БТГ выделена на его 3D-модели (рис. 1, *a*). Дно «каньона» активного центра БТГ обогащено гидрофобными аминокислотными остатками, а его стены – положительно заряженными. Каталитическое действие гиалуронидазы позвоночных осуществляется по субстрат-опосредованному

механизму [7]. Произведенные нами расчеты показывают возможность осуществления такого каталитического механизма и в нашей 3D-модели БТГ (рис. 1, *b*).

Минимальным субстратом для гиалуронидазы человека выступает октасахарид (из пиранозных колец) гиалуронана, в котором димерное звено гиалуронана повторяется 4 раза [32], а для БТГ – гексасахарид [7]. Такое различие объясняется разной аффинностью связывания дисахаридных звеньев гиалуронана в сорбционных центрах этих ферментов. На нашей 3D-модели БТГ додекасахарид гиалуронана, как фрагмент субстрата, полностью закрывает «долину/желобок» активного центра (рис. 1, *b*).

Иерархия лизиновых остатков БТГ. Остатки лизина БТГ выступают эффективными центрами ковалентного взаимодействия при получении модифицированных производных гиалуронидазы [27, 28]. Актуальность их получения определяется практическими потребностями медицины в стабилизированных ферментных препаратах терапевтического назначения [16, 17]. Важно обеспечить при этом снижение ингибируемости ферментных средств, пролонгацию их действия, нацеленность на очаг поражения. Этому служит селективная модификация поверхностных функциональных групп белка, в частности гиалуронидазы, для разработки стимулирующих средств регенеративной клеточной терапии [33, 34] и антираковых препаратов [10, 11, 35].

В результате анализа 3D-структуры БТГ обнаруживается суммарно 24 аминокислотных остатка лизина (табл. 3). Из них 21 а.о. экспонирован на поверхности белковой глобулы, т.е. образует коротких кулоновских внутримолекулярных связей с остатками аспарагиновой или глутаминовой аминокислот. Отмеченное взаимодействие заметно повышает pK_a депротонизации ϵ -аминогруппы остатка лизина, необходимой для его эффективной химической модификации (рис. 2, см. цветную вклейку).

Таблица 2. Содержание элементов вторичной структуры в разных гиалуронидазных структурах и пространственной модели БТГ

Виды гиалуронидаз	Содержание элементов вторичной структуры, %		
	α -спираль	β -структура	неупорядоченная структура
Гиалуронидаза яда пчел	40	19	31
БТГ	37	15	48
Гиалуронидаза человека	37	16	47

Наиболее подходящими для модификации оказываются остатки лизина, расположенные в зонах абсолютно доступных растворителю и гидрофильному реагенту со стоксовским радиусом 12 Å. Такие остатки лизина не вовлечены в ближние внутримолекулярные кулоновские или Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия. Это остатки лизина первого уровня доступа, их шесть (по позициям): 129, 176, 271, 292, 446, 447 (табл. 3).

Защищены взаимодействиями с другими аминокислотными остатками и доступны реа-

гентам со стоксовским радиусом 6 Å следующие четыре остатка лизина (по позициям): 82, 244, 376, 392. К ним могут быть добавлены еще два остатка лизина, способных при повороте белковой цепи взаимодействовать с остатками глутаминовой (Glu 184 и Glu 194) или аспарагиновой (Asp 157 и Asp 166) аминокислот. Хотя и более затрудненно, остатки лизина Lys 187 и Lys 190 могут вступать в химическое взаимодействие. Таким образом, дополнительно отбираются к шести остаткам лизина первого уровня доступа

Таблица 3. Стратификация остатков лизина и взаимодействующие с ними остатки дикарбоновых аминокислот в 3D-структуре БТГ

Остаток, взаимодействующий с остатком лизина	Номер остатка лизина			
	внешние свободные остатки лизина	внешние полусвободные остатки лизина	остатки лизина, влияющие на каталитический домен БТГ	маскированные внутри глобулы БТГ остатки лизина
Glu 58	— —	— Lys 82	Lys 77 —	— —
Asp 104, Glu 105	—	—	Lys 106	—
Glu 171, Glu 168	—	—	Lys 109	—
Glu 126	—	—	Lys 122	—
Asp 131	— Lys 129	— —	— —	Lys 127 —
Glu 149	— Lys 176	— —	— —	Lys 162 —
Glu 184	—	Lys 187	—	—
Glu 194	—	Lys 190	—	—
Glu 251	—	—	Lys 198	—
Glu 203	—	—	Lys 206	—
Asp 37	— —	— Lys 244	— —	Lys 209 —
Glu 297	— Lys 271 Lys 292 — —	— — — Lys 376 Lys 392	Lys 255 — — — —	— — — — —
Glu 413	—	—	Lys 416	—
Asp 433, Glu 426	— Lys 446 Lys 447	— — —	Lys 430 — —	— — —
Всего остатков лизина	6	6	9	3

Примечание. В построенной модели 3D-структуры БТГ мы пренебрегли присутствием остатков лизина в исключенном из рассмотрения ее C-концевом домене.

еще шесть потенциально пригодных для химического взаимодействия остатков лизина (по позициям): 82, 187, 190, 244, 376, 392. Это остатки лизина второго уровня доступа (табл. 3).

Пространственное расположение всех этих двенадцати остатков лизина первого и второго уровня доступа таково, что их модификация ХС [17] не может оказать достаточно заметного влияния (может быть, за исключением Lys 82, находящегося у порога зоны активного центра) на ферментативную активность, но может повлиять на время полужизни фермента в организме. Модификация Lys 82 может затруднить удаление продукта реакции гидролиза гиалуронана, что приведет к снижению скорости гидролиза протяженных молекул субстрата, но не коротких модельных соединений.

Оставшиеся девять остатков лизина, доступных растворителю, составляют группу (по позициям): 77, 106, 109, 122, 198, 206, 255, 416, 430. Это остатки лизина третьего уровня доступа (табл. 3). При повышении pH они могут реагировать с активированным ХС. Такое взаимодействие должно приводить к значительным структурным изменениям каталитического домена БТГ, но не обязательно вызывать деструкцию активного центра биокатализатора (рис. 2).

Маскированными внутри глобулы БТГ оказываются три остатка лизина (по позициям): 127, 162 и 209 (табл. 3). Они расположены либо в области активного центра фермента (Lys 162...Glu 149), либо вблизи его (Lys 127...Asp 131), либо заметно заглублены (Lys 209...Asp 37). Химическое взаимодействие с Lys 162 неизбежно вызовет деструкцию активного центра БТГ. Его больших деформаций, видимо, можно ожидать и при вовлечении во взаимодействие Lys 127 и Lys 209. Маскированные остатки лизина (по позициям: 127, 162 и 209) представляются непригодными для продуктивного получения гиалуронидазных модифицированных форм.

Стабилизированные формы этого фермента были экспериментально получены при высоких степенях модификации (80–98%) поверхностных остатков лизина в БТГ, определенных по титрованию аминокрупп ТНБС [16, 17, 27, 28]. Поскольку точные экспериментальные данные об участии конкретных остатков лизина в модификации фермента отсутствовали, мы могли вести построение 3D-структуры БТГ–ХС на основании предположения о вовлеченности в ковалентное взаимодействие разных групп остатков лизина различного уровня доступа.

Поверхностный электростатический потенциал 3D-модели БТГ. Возникающая пространственная локализация заряженных в определенных условиях аминокислотных остатков 3D-модели

БТГ определяет имеющийся у нее поверхностный электростатический потенциал. Карта распределения напряженности электрического поля молекулы БТГ показана на рис. 3, а (см. цветную вклейку). Отрицательно заряженный ХС будет преимущественно электростатически связываться с положительно заряженными участками белка (обозначены синим цветом) и избегать взаимодействия с участками, несущими выраженный отрицательный заряд (показаны красным цветом). Заметно расположение остатков лизина первого уровня доступа по зонам положительно заряженных участков белковой поверхности БТГ (рис. 3, а).

Проведением докинга тетрамеров ХС (октасахаридные ХС-фрагменты) с 3D-моделью БТГ была получена компактная, практически полностью нейтральная структура электростатического комплекса БТГ..(тетрамер ХС)₄. Затем тетрамеры ХС, расположенные близко друг к другу, были ковалентно сшиты с образованием линейных полимеров длиной в 46, 14, 8 и 8 сахаридных мономеров, удерживаемых 3D-моделью БТГ электростатически. «Лишние» мономеры, уходящие от белка, были удалены. После этого заряд ХС был доведен до расчетного на основании Дебай-Хюккелевского алгоритма (AM1-BCC) и Gestinger-алгоритма [36, 37] с добавлением соответствующего количества катионов натрия для достижения электронейтральности полученной системы в заполненном водой периодическом боксе, размерами, в 1,5 раза превышающими размеры образующегося электростатического комплекса. Нейтрализующие систему ионы, таким образом, попали в нее снаружи. Полученная структура была стабильна при молекулярной динамике при 300 К в течение 300 пс. Вид этого электростатического комплекса БТГ с олигомерами ХС приведен на рис. 3, б. В нем сохраняется доступ субстрата к активному центру биокатализатора, что обеспечивает реализацию ферментной функции указанным электростатическим комплексом.

Приведенный выше подход для моделирования ковалентного связывания активированного бензохиноном ХС с остатками лизина по позициям 176 и 447 (из группы остатков лизина первого уровня доступа, расположенных на удалении друг от друга по краям глобулы БТГ) был использован для построения 3D-модели БТГ, ковалентно связанной с двумя олигомерами ХС (длиной 46 и 14 сахаридных мономеров, рис. 3, в). Ее вид подтверждал субстратную доступность активного центра фермента и продуктивность получения модифицированных ХС форм БТГ с большей величиной степени модификации и длиной ХС цепи. Сравнение вида 3D-моделей

электростатического (рис. 3, б) и ковалентного (рис. 3, в) комплекса БТГ с ХС демонстрировало некоторое «разбухание» структуры ковалентного конъюгата. Обнаруженные отклонения от стандартных углов и длин связей вблизи контактных остатков лизина в электростатическом комплексе БТГ...ХС были существенно меньше, чем в ковалентном конъюгате БТГ–ХС. Ковалентная модификация фермента приводила к большему искажению его нативной 3D-структуры.

Построение 3D-модели БТГ–ХС. Необходимость вовлечения в модифицирующие взаимодействия значительной доли поверхностных аминокислот БТГ обусловлена тем, что именно при высоких степенях модификации (70–80%) было экспериментально обнаружено резкое снижение гепаринового ингибирования фермента [38] и достигалось получение его стабилизированных форм [16, 17, 27, 28]. Использование для модификации ХС (30–50 кДа) обуславливает возрастание молекулярной массы ферментного производного до значений более 180 кДа [27]. Контролирование условий связывания [17, 27] позволяет предполагать присоединение максимум 4–6 цепей ХС к молекуле БТГ уже при взаимодействии с шестью остатками лизина первого уровня доступа. Пространственное положение цепей ХС соответствует одной из 60 000 наиболее населенных компактных форм образующегося производного. Представление о вариации положения ХС можно получить из видов 3D-структур БТГ–ХС, полученных с разной степенью модификации: шести остатков лизина первого уровня доступа (рис. 4, а; см. цветную вклейку), а также всех двенадцати остатков лизина первого и второго уровней доступа (рис. 4, б). Как упоминалось выше, их модификация не должна вызывать заметной деформации области активного центра БТГ, что соответствует экспериментальным данным [27]. Важно при этом отметить, что модификация БТГ по шести остаткам лизина не обеспечивает экранирования от ингибирующего взаимодействия с гепарином. Основные положительно заряженные участки БТГ остаются экспонированными (рис. 4, а). Модификация БТГ по двенадцати лизинам не позволяет создать защитную оболочку ХС вокруг модифицируемого фермента из-за существенного увеличения отрицательного заряда, привносимого ХС. Его остатки «топорщатся» над ферментной глобулой (рис. 4, б). Эти данные вместе с экспериментальными результатами [17, 27] указывают на значимость глубоких степеней модификации БТГ, многоточечного ковалентного присоединения к ней полимерной цепи ХС достаточной длины, чтобы укреплять структуру белка против ее разворачивания при

инактивации и экранировать от поражающего взаимодействия с внешними ингибиторами/инактиваторами [28, 39]. Вероятно, такая ХС-оболочка БТГ, порой плотно прилегающая к ней для стабилизации белковой структуры (как бы «сшивая» ее при многоточечном присоединении ХС-полимера), а порой обволакивающая ее для экранирования от действия инактивирующих агентов (т.е. достигая оптимума соотношения жесткость/подвижность белковой глобулы при экранировании ее полисахаридным агентом), будет способствовать эффективному функционированию модифицированных форм фермента в условиях практического использования [17, 40]. Таким образом, ковалентная модификация биокатализатора полимером должна достигать продуктивного равновесия в стабилизации структуры БТГ.

Титрование ТНБС поверхностных аминокислот БТГ подтвердило, что для получения стабилизированных форм биокатализатора следует добиваться либо практически полного (90–98%) блокирования его аминокислот [16, 38], либо весьма глубокой (82–88%) их модификации [17, 27]. Конформационные изменения БТГ при высоких степенях модификации фермента [28] затрудняют экспериментальное определение различия между заблокированными химическим взаимодействием аминокислотами и их стерическим маскированием. Способствует этому и использование ХС высокой молекулярной массы 120–140 кДа [17]. Построение 3D-структуры БТГ–ХС с использованием высокомолекулярных цепей ХС продемонстрировало теоретически, что блокирование всех поверхностных остатков лизина достигается присоединением уже двух олигомерных фрагментов ХС (суммарно 320–480 сахаридных колец с увеличением молекулярной массы производного на 80 кДа и более). Случайная топология построения ХС-полимера позволяет получить 3D-структуру БТГ–ХС, когда фермент экранируется двумя цепями ХС, присоединенными по 19 остаткам лизина (рис. 5, см. цветную вклейку). Модельное увеличение/наращивание длины полимерной цепи ХС может обеспечить/достичь почти полного окружения ферментной глобулы ХС-оболочкой. Исключением при этом предстают два участка глобулы БТГ, лишенные поверхностных остатков лизина. Один из таких участков – область активного центра БТГ. Полученные результаты согласуются с экспериментальными данными о заметной остаточной эндогликозидазной активности (68–78%) БТГ после ее глубокой модификации ХС разной молекулярной массы [17, 27]. Таким образом, теоретические данные подчеркивают, что самая разнообразная ХС-модифи-

кация БТГ по ее остаткам лизина не ведет к существенному изменению доступности активного центра фермента. Это означает, что теоретический анализ 3D-структуры БТГ позволяет предсказать возможность различной химической модификации всех экспонированных в объеме растворителя остатков лизина этого белка (например, прокраску флуоресцентными красителями, присоединение квантовых точек/дотов, спейсеров, лигандов, в т.ч. полимерного, а не сополимерного [17] состава и др.) без заметного снижения активности фермента, если условия реакции не способствуют затрагиванию маскированных внутри глобулы БТГ остатков лизина (что непреложно инактивирует биокатализатор).

Впервые была получена 3D-структура БТГ, ковалентно модифицированной ХС, с варьированием степени модификации остатков лизина фермента и размеров его гликозаминогликановой оболочки. Теоретически обосновано, что по мере увеличения деформирующего действия модификатора на фермент (с ростом степени модификации) происходит постепенное снижение его активности. Модификация менее доступных функциональных групп биокатализатора (при глубоких степенях модификации) вызывает решающие изменения его активности и стабильности. Для БТГ весьма отчетливо выявляется стратификация ее остатков лизина как регуляторных центров присоединения модификатора. Многоточечное ковалентное связывание ХС-цепей с БТГ укрепляет ферментную структуру (за счет ее «сшивания» полимером) и

может экранировать белковую глобулу от внешних неблагоприятных воздействий. При блокировании всех поверхностных остатков лизина БТГ ясно проявляется эффективный размер полимера-модификатора, достаточный для стабилизации биокатализатора. Для получения значимо активной формы БТГ–ХС теоретически необходимо увеличение ее молекулярной массы до ориентировочного рубежа 140–180 кДа. Подходящими для этого (как подтверждают экспериментальные результаты) оказываются ХС разной молекулярной массы (30–50 и 120–140 кДа). Следует отметить, что топография поверхностных остатков лизина БТГ при этом способствует сохранению доступа субстрата к активному центру модифицированного полимером фермента.

Построение 3D-структур БТГ и БТГ–ХС перспективно для проведения сравнительного изучения *in silico* их взаимодействия с разными агентами (сахаридами, продуктами деградации гликокаликса, гликозаминогликановым микроокружением и т.п.) и поведения в разных условиях (различающихся по величине ионной силы среды, ее ионному составу, температуре, трансгликозилазной активности и пр.). В результате могут быть обнаружены лимитирующие преимущества ферментных структур для их обоснованной последующей экспериментальной проверки *in vitro* и *in vivo* в ходе биомедицинских исследований.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (гранты 12-04-00015 и 15-04-03584) и Минздрава России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Максименко А.В. (2012) Кардиологические биофармацевтики в концепции направленного транспорта лекарств: практические результаты и исследовательские перспективы, *Acta Naturae*, **4**, 76–86.
2. Batool, S., Ferdous, S., Kamal, M.A., Iftikhar, H., and Rashid, S. (2013) *In silico* screening for identification of novel Aurora kinase inhibitors by molecular docking, dynamics simulations and ligand-based hypothesis approaches, *Enz. Eng.*, **2**, 1.
3. Wu, Z.L. (2012) Time for molecular glycobiology, *J. Glycobiol.*, **1**, e106. DOI: 10.4172/2168-958X.1000e106.
4. Maksimenko, A.V., and Turashev, A.D. (2012) No-reflow phenomenon and endothelial glycocalyx of microcirculation, *Biochem. Res. Int.*, 859231. DOI: 10.1155/2012/859231.
5. Reitsma, S., Slaaf, D.W., Vink, H., van Zandvoort, M.A., and oude Egbrink, M.G.A. (2007) The endothelial glycocalyx: compositions, functions, and visualization, *Pflugers Arch.*, **454**, 345–359.
6. Rubio-Gayosso, I., Platts, S.H., and Duling, B.R. (2006) Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **290**, 2247–2256.
7. Stern, R., and Jedrzejewski, M.J. (2006) Hyaluronidases: their genomics, structure, and mechanism of action, *Chem. Rev.*, **106**, 818–839.
8. Vink, H., and Duling, B.R. (2000) Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **278**, 285–289.
9. Platts, S.H., and Duling, B.R. (2004) Adenosine A3 receptor activation modulates the capillary endothelial glycocalyx, *Circ. Res.*, **94**, 77–82.
10. Stern, R. (2008) Hyaluronidases in cancer biology, *Semin. Cancer Biol.*, **18**, 275–280.
11. Toole, B.P., Wight, T.N., and Tammi, M.I. (2002) Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease, *J. Biol. Chem.*, **277**, 4593–4596.
12. Stern, R., and Jedrzejewski, M.J. (2008) Carbohydrate polymer at the center of life's origins: the importance of molecular processivity, *Chem. Rev.*, **108**, 5061–5085.
13. Erickson, M., and Stern, R. (2012) Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism, *Biochem. Res. Int.*, 893947. DOI: 10.1155/2012/893947.
14. Markovich-Housley, Z., Miglierini, G., Soldatova, L., Rizkallah, P.J., Muller, U., and Schirmer, T. (2000) Crystal

- structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom, *Structure*, **8**, 1025–1035.
15. Chao, K.L., Muthukumar, L., and Herzberg, O. (2007) Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis, *Biochemistry*, **46**, 6911–6920.
 16. Максименко А.В., Щечилина Ю.В., Тищенко Е.Г. (2001) Модифицированная декстраном гиалуронидаза резистентна к ингибированию гепарином, *Биохимия*, **66**, 563–572.
 17. Максименко А.В., Щечилина Ю.В., Тищенко Е.Г. (2003) Гликозаминогликановое микроокружение гиалуронидазы в регуляции ее эндогликозидазной активности, *Биохимия*, **68**, 1055–1062.
 18. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M.C. (2003) Swiss-model: an automated protein homology-modeling server, *Nucl. Acids Res.*, **31**, 3381–3385.
 19. Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. (2006) The Swiss-model workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling, *Bioinformatics*, **22**, 195–201.
 20. Schindyalov, I.N., and Bourne, P.E. (1998) Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path, *Protein Eng.*, **11**, 739–747.
 21. Laskovski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993) Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystal.*, **26**, 283–291.
 22. Morris, A.L., MacArthur, M.W., Hutchinson, E.G., and Thornton, J.M. (1992) Stereochemical quality of protein structure coordinates, *Proteins*, **12**, 345–364.
 23. Vriend, G. (1990) WHAT IF: a molecular modeling and drug design program, *J. Mol. Graph.*, **8**, 52–56.
 24. Melo, F., Devos, D., Depiereux, E., and Feytmans, E. (1997) Anolea: a www server to assess protein structures, *Proc. Int. Conf. Intel. Syst. Mol. Biol.*, **5**, 187–190.
 25. Melo, F., and Feytmans, E. (1998) Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy, *J. Mol. Biol.*, **277**, 1141–1152.
 26. Melo, F., and Feytmans, E. (1997) Novel knowledge-based mean force potential at atomic level, *J. Mol. Biol.*, **267**, 207–222.
 27. Maksimenko, A., Turashev, A., Fedorovich, A., Rogoza, A., and Tischenko, E. (2013) Hyaluronidase proof for endothelial glycocalyx as partaker of microcirculation disturbances, *J. Life Sci.*, **7**, 171–188.
 28. Турашев А.Д., Тищенко Е.Г., Максименко А.В. (2009) Гликирование нативной и модифицированной хондроитинсульфатом гиалуронидазы моносахаридами, *Мол. медицина*, **3**, 51–56.
 29. Belem-Goncalves, S., Tsan, P., Lancelin, J.-M., Alves, T.L.M., Salim, V.M., and Besson, F. (2006) Interfacial behavior of bovine testis hyaluronidase, *Biochem. J.*, **398**, 569–576.
 30. Botzki, A., Rigden, D.J., Braun, S., Nukui, M., Salmen, S., Hoechstetter, J., Bernhardt, G., Dove, S., Jedrzejak, M.J., and Buschauer, A. (2004) L-ascorbic acid G-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor. X-ray structure and molecular modeling of enzyme-inhibitor complexes, *J. Biol. Chem.*, **279**, 45990–45997.
 31. Zhang, L., Bharadwaj, A.G., Casper, A., Barkley, J., Barycki, J.J., and Simpson, M.A. (2009) Hyaluronidase activity of human Hyal1 requires active site acidic and tyrosine residues, *J. Biol. Chem.*, **284**, 9433–9442.
 32. Hofinger, E.S., Bernhardt, G., and Buschauer, A. (2007) Kinetics of hyal-1 and PH-20 hyaluronidases: comparison of minimal substrates and analysis of the transglycosylation reaction, *Glycobiology*, **17**, 963–971.
 33. Dygai, A.M., Zyuz'kov, G.N., Zhdanov, V.V., Udut E.V., Miroshnichenko, L.A., Simanina, E.V., Khrichkova, T.Yu., Minakova, M.Yu., and Madonov P.G. (2013) Specific activity of electron-beam synthesis immobilized hyaluronidase on G-CSF induced mobilization of bone marrow progenitor cells, *Stem Cell Rev. Rep.*, **9**, 140–147.
 34. Зюзьков Г.Н., Максименко А.В., Жданов В.В., Удут Е.В., Турашев А.Д., Мирошниченко Л.А., Симанина Е.В., Чайковский А.В., Минакова М.Ю., Артамонов А.В., Бекарев А.А., Мадонов П.Г., Удут В.В., Дыгай А.М. (2013) Специфическая активность модифицированной хондроитинсульфатом гиалуронидазы в отношении функций прогениторных клеток, *Клеточные технол. биол. мед.*, **4**, 193–196.
 35. Hedin, P., Basu, K., Olofsson, B., Porsch, H., Kozlova, I., and Kahata, K. (2013) Deregulation of hyaluronan synthesis, degradation and binding promotes breast cancer, *J. Biochem.*, **154**, 395–408.
 36. Wang, J., Wang, W., Kollman, P.A., and Case, D.A. (2006) Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations, *J. Mol. Graph. Model.*, **25**, 247–260.
 37. Wang, J., Wolf, R.M., Caldwell, J.W., Kollman, P.A., and Case, D.A. (2004) Development and testing of a general amber force field, *J. Comput. Chem.*, **25**, 1157–1174.
 38. Maksimenko, A.V., Petrova, M.L., Tischenko, E.G., and Schechilina, Y.V. (2001) Chemical modification of hyaluronidase regulates its inhibition by heparin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **51**, 33–38.
 39. Турашев А.Д., Тищенко Е.Г., Максименко А.В. (2009) Неферментативное гликозилирование нативной и модифицированной хондроитинсульфатом гиалуронидазы дисахаридами, *Мол. медицина*, **6**, 50–55.
 40. Максименко А.В. (2008) Эффекты гликозаминогликанов в сосудистых событиях, *Хим.-фарм. журн.*, **42**, 3–13.

**STRATIFICATION OF JOINING SITES
FOR CHONDROITIN SULFATE TO ENZYME
ON A 3D-MODEL OF BOVINE TESTICULAR
HYALURONIDASE AND EFFECTIVE SIZE
OF GLYCOSAMINOGLYCAN COAT
OF MODIFIED PROTEIN**

A. V. Maksimenko*, A. D. Turashev, R. S. Beabealashvili

*Institute of experimental cardiology, Russian Cardiology
Research-and-Production Complex, 3-rd Cherepkovskaya ul. 15a,
Moscow 121552, Russia; fax: +7(495)414-6699,
E-mail: alexmak@cardio.ru*

Received February 21, 2014

Revision received September 29, 2014

A 3D-model of bovine testicular hyaluronidase (BTH) was built based on established tertiary structure of human hyaluronidase (Hyal1) with a molecular homological modeling method *in silico*. Analysis of the 3D-model of BTH demonstrated the existence of lysine residue stratification during modification of the enzyme. The 3D-model of chondroitin sulfate (CHS)-modified hyaluronidase (BTH-CHS) was obtained by modeling the covalent coupling of lysine residues with benzoquinone-activated CHS. The degree of enzyme modification and length of CHS chains were varied during 3D modeling of the BTH-CHS structure. The importance of deep BTH modification degree was shown for formation of active and stable enzyme derivatives determined earlier experimentally. The effective size of CHS coat for productive BTH modification was confirmed. The combination of computational chemistry methods *in silico* and experimental approaches *in vitro* and *in vivo* is reasonable for productive biomedical studies.

Key words: bovine testicular hyaluronidase, tertiary structure, chondroitin sulfate, lysine residue modification, hyaluronidase-chondroitin sulfate conjugate, modification degree, chondroitin sulfate coat