

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МУТАНТНЫХ ФОРМ L-АСПАРАГИНАЗЫ ИЗ *RHODOSPIRILLUM RUBRUM*, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИТЕЛОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

М.В. Покровская<sup>1\*</sup>, С.С. Александрова<sup>1</sup>, А.В. Веселовский<sup>1</sup>, Д.Д. Жданов<sup>1,2</sup>, В.С. Покровский<sup>1,2</sup>,  
М.А. Эльдаров<sup>3</sup>, Д.В. Гришин<sup>1</sup>, Ю.А. Гладилина<sup>1</sup>, И.Ю. Торопыгин<sup>1</sup>, Н.Н. Соколов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121, Москва, ул. Погодинская 10; \*e-mail: ivan1190@yandex.ru

<sup>2</sup>Российский университет дружбы народов, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая 6

<sup>3</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект 33, стр. 2

Белок Rru\_A3730, известный как бактериальная L-аспарагиназа *Rhodospirillum rubrum*, представляет интерес в качестве потенциального противоопухолевого средства, особенно ее варианты с точечными аминокислотными заменами в районе 150 аминокислотного остатка (а.к.о.): RrA<sub>17N, K149E</sub>, RrA<sub>E149R, V150P, F151T</sub>, RrA<sub>17N, E149R, V150P</sub>, RrA<sub>E149R, V150P</sub> обладающие не только антипролиферативными свойствами, но и способностью подавлять активность теломеразы. Данная работа посвящена сравнению физико-химических и каталитических свойств этих мутантных форм RrA. Показано, что для всех изученных вариантов RrA pH оптимум находится в щелочной зоне (8.5 – 9.3); L-глутаминазная и D-аспарагиназная активность составляют, соответственно, не более 0.1% и 1.6% от L-аспарагиназной. Присутствие 17N-концевой аминокислотной последовательности MASMTGGQQMGRGSSRQ капсидного белка бактериофага T7 в структуре RrA приводит к повышению термостабильности мутантных аналогов RrA (от 50°C до 56°C) и их устойчивости к денатурации в присутствии 3 – 4 М мочевины. Выявлен разнонаправленный эффект ионов металлов на L-аспарагиназную активность вариантов RrA: ионы K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Co<sup>2+</sup> существенно не влияют на активность L-аспарагиназы, добавление ионов Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> приводит к снижению активности. Не обнаружено корреляции между антителомеразной (антипролиферативной) активностью и кинетическими свойствами мутантных форм L-аспарагиназы RrA.

**Ключевые слова:** L-аспарагиназа *Rhodospirillum rubrum*; сайт-направленный мутагенез; физико-химические свойства

DOI: 10.18097/BMCRM00071

## ВВЕДЕНИЕ

Бактериальные L-аспарагиназы из *Escherichia coli* (EcA) и *Erwinia* (ErA) применяются для лечения острого лимфобластного лейкоза и некоторых лимфопролиферативных заболеваний в течение более 4-х десятилетий [1]. L-аспарагиназы (КФ 3.5.1.1.) катализируют гидролиз амидной группы боковой цепи L-аспарагина с образованием L-аспарагиновой кислоты и аммиака. Считается, что механизм цитотоксического действия и терапевтической эффективности L-аспарагиназ связан с истощением уровня свободного L-аспарагина в сыворотке крови и нарушением синтеза белка преимущественно в опухолевых клетках, отличающихся сниженным уровнем или полным отсутствием в них активности аспарагинсинтазы, в отличие от здоровых тканей [2–4].

Предполагается, что антипролиферативное (цитотоксическое) действие L-аспарагиназ сопровождается способностью фермента гидролизовать наряду с L-аспарагином и L-глутамин, что обуславливает развитие ряда побочных эффектов [5, 6]. Детальный механизм каталитического действия L-аспарагиназ, молекулярная основа их противоопухолевой активности и побочных эффектов при лечении, включая резистентность к терапии, до конца не ясны.

Повышение в большинстве типов опухолей активности теломеразы, синтезирующей теломерные повторы TTAGGG

на концах хромосом человека и предотвращающей их укорочение при репликации, обуславливает неограниченный потенциал клеточного деления [7]. Обычно, hTERT – каталитическая субъединица теломеразы, регулирующая уровень синтеза мультибелкового комплекса фермента – значительно активирована в опухолевых, но репрессирована в нормальных соматических клетках [8]. Повышенная активность теломеразы может быть одним из критических условий канцерогенеза, поэтому подавление функции hTERT и, следовательно, активности теломеразы является одним из подходов к терапии злокачественных опухолей [9].

Ранее нами был клонирован ген L-аспарагиназы *Rhodospirillum rubrum* RruA 3730 (RrA) в вектор pET23 [10]. Составной белок RrA<sub>17N, E149R</sub> включает 17N-концевую аминокислотную последовательность (MASMTGGQQMGRGSSRQ) с капсидным пептидом бактериофага T7 [11]. Мутантная форма внутриклеточной L-аспарагиназы из *Rhodospirillum rubrum* RrA<sub>17N, K149E</sub> проявляла цитотоксическую (антипролиферативную) активность *in vitro* на клетках Jurkat, HL-60, MOLT 4 и др. [12] и *in vivo* у мышей с лимфаденозом Фишера L5178y [13], а также подавляла на 80% экспрессию теломеразы *in vitro* [14]. Вариант RrA<sub>17N, E149R, V150P</sub> с дополнительными заменами E149R и V150P еще сильнее снижал активность теломеразы до 15% от контроля в клетках Jurkat, HL-60, MOLT 4 и др. При удалении фрагмента 17N-концевой аминокислотной последовательности активность теломеразы



восстанавливалась до 79% от исходного уровня ( $RrA_{E149R, V150P}$ ). Вариант  $RrA_{E149R, V150P, F151T}$  отличается от  $RrA_{E149R, V150P}$  заменой только одного аминокислотного остатка (F151T), но его антителомеразная активность была сопоставима с таковой у мутантных форм  $RrA_{I7N, E149R, V150P}$  и  $RrA_{I7N, K149E}$  [14].

Мутантные формы  $RrA_{I7N, D60K, F61L}$  и  $RrA_{I7N, A64V, E67K}$  и др., а также используемые в медицине L-аспарагиназы EcA и ErA способностью подавлять активность теломеразы не обладают [14].

В связи с этим возникает вопрос, связано ли усиление антипролиферативных свойств мутантных форм RrA именно с изменением ферментативных свойств или с появлением новых регуляторных.

RrA является первой цитоплазматической L-аспарагиназой, проявляющей антипролиферативную активность, обладающей низкой L-глутаминазной активностью (менее 0.1% от L-аспарагиназной), небольшой молекулярной массой (субъединица – 18 кДа, мономер содержит 172 аминокислотных остатка) и имеющей низкую гомологию с EcA и ErA.

Варианты RrA с точечными мутациями, подавляющие активность теломеразы, представляют интерес как потенциальные противоопухолевые агенты с принципиально иным механизмом действия, в отличие от используемых в медицине L-аспарагиназ EcA и ErA.

Целью настоящей работы был анализ взаимосвязи между физико-химическими и кинетическими свойствами мутантных вариантов RrA, с одной стороны, и цитотоксичностью и способностью подавлять активность теломеразы – с другой.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Реактивы

В работе использовали: L-аспарагин («Reanal», Венгрия), глицин,  $KH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $NaH_2PO_4$ , KCl («Serva», Германия), L-глутамин, реактив Несслера, ТХУ, бакто-триптон, бакто-дрожжевой экстракт («Fluka», Швейцария); NaOH,  $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ , глюкоза, лактоза («Merck», Германия); Tris («Bio-Rad», США); HCl,  $CH_3COOH$ ,  $CH_3COONa$  («Реахим», Россия), ферменты и реактивы для ПЦР («СибЭнзим», Россия).

### Бактериальные штаммы и их культивирование

Штаммы *Escherichia coli* XL-blue («Stratagen», Германия) и BL21(DE3) («Novagen», США) культивировали согласно условиям, описанным ранее [10, 12]. Индуктор (лактозу) добавляли в среду при  $OD_{600} \sim 1.2$  до конечной концентрации 0.2%. Спустя 14–20 ч после индукции клетки собирали центрифугированием при 2500 g, 15 мин.

### Мутантные формы RrA

$RrA_{E149R, V150P, F151T}$ ,  $RrA_{I7N, E149R, V150P}$ ,  $RrA_{E149R, V150P}$  были получены с помощью сайт-направленного мутагенеза («Quik Change») Single-Primer Reactions in Parallel, используя вектор pET23a («Novagen», США), несущий ген RrA в качестве матрицы [12]. Мутации были подтверждены секвенированием ДНК по методу Sanger и др. [15].

### Выделение и очистка L-аспарагиназ

Стадии выделения и очистки L-аспарагиназ из клеток штамма-продуцента включали ультразвуковую обработку суспензии клеток, удаление дебриса центрифугированием (35000 g, 30 мин), две стадии ионообменной хроматографии на колонках с Q-Sepharose («Pharmacia», Швеция) и DEAE-Toyopearl 650m («ToyoSoda», Japan), ультрафильтрацию, обессоливание и концентрирование на PM10 мембранах («Millipore», США) в ячейке «Amicon», как описано ранее [12]. Все стадии очистки проводили при 4°C. Препараты L-аспарагиназ были стабилизированы глюкозой (до конечной концентрации 0.5%) и лиофилизированы. Ферменты хранили при -80°C.

### ПААГ-электрофорез и определение молекулярной массы и концентрации белка

Концентрацию белка определяли методом Sedmak [16], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Чистоту белка и его молекулярную массу определяли при помощи электрофореза в 12.5%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na по методу Laemmli, используя в качестве контроля Protein Molecular Weight marker (#SM0431, «Thermo Fisher Scientific Inc», США) [17].

### Определение ферментативной активности L-аспарагиназы

Об активности фермента судили по количеству образовавшегося аммиака, которое определяли методом прямой несселеризации [18]. За единицу активности L-аспарагиназы (1 ME) принимали количество фермента, катализирующее высвобождение 1 мкмоль аммиака в мин при 37°C. Удельную активность выражали в ME/мг белка.

Субстратную специфичность вариантов RrA оценивали этим же методом, используя в качестве субстрата L-аспарагин, L-глутамин, D-аспарагин в концентрации 8–200 mM.

### Влияние ионной силы на ферментативную активность вариантов RrA

Зависимость активности RrA от ионной силы исследовали в 0.01 M  $NaHCO_3$  и 0.1 M Na-фосфатном буферах (pH 7.4), изменяя концентрацию KCl от 0 до 3 M.

### Влияние pH на ферментативную активность вариантов RrA

Активность очищенного фермента ( $pH_{opt}$ ) изучали в интервале pH 4.5–9.7 при 37°C с L-аспарагином в качестве субстрата, как описано ранее [12].

### Влияние температуры на ферментативную активность RrA

Температурный оптимум активности L-аспарагиназы ( $T_{opt}$ ) определяли в инкубационной смеси в 0.1 M Na-фосфатном буфере (pH 7.4) при температуре 25–70°C, как описано ранее [12, 19].

### Температурная и химическая денатурация

Температурную денатурацию изучали в реакционной смеси (без субстрата), содержащей фермент и 0.1 М Na-фосфатный буфер (pH 7.5), прогретой при 30–80°C в течение 10 мин. После инкубации стандартным способом оценивали остаточную ферментативную активность [18] и выражали её как процент активности прогретого фермента по отношению к непрогретому.  $T_{50}$  – значение температуры, при которой фермент теряет 50% своей активности. Химическую денатурацию изучали при инкубации фермента (без субстрата) при 37°C в течение 1 ч при концентрации мочевины 0–8 М в 0.1 М Na-фосфатном буфере, (pH 7.4 и 9.2). После этого определяли остаточную активность фермента. За 100% принимали активность фермента при 37°C в отсутствии мочевины.

### Кинетические свойства

Определение кинетических параметров ферментов проводили, как описано ранее [12], в 0.1 М Na-фосфатном буфере pH 7.5 и боратном буферах pH 9.2.

Обработку полученных данных и расчет  $K_m$  и  $V_{max}$  проводили при помощи программы Prism software version 7 («Graph pad», США).

Расчетные характеристики белка, определяющие его стабильность в растворе, анализировали с помощью ProtParam, доступной на сайте <http://tw.expasy.org/tools/protparam.html>.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

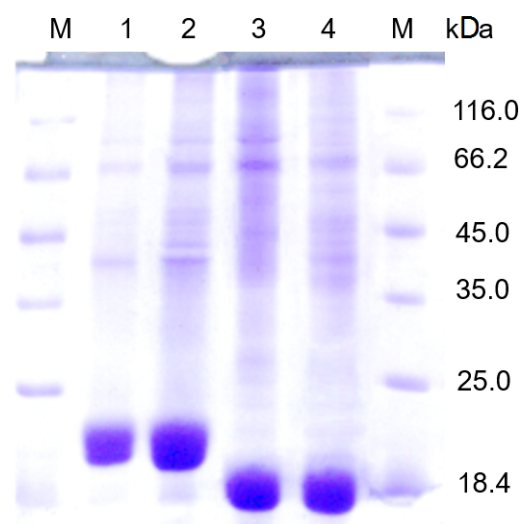
Проведено сравнение некоторых физико-химических и каталитических свойств вариантов RrA с точечными аминокислотными заменами: RrA<sub>17N,D60K,V150P</sub>, RrA<sub>17N,A64V,E67K</sub>, RrA<sub>17N,K149E,RrA<sub>E149R,V150P</sub></sub>, RrA<sub>17N,E149R,V150P</sub> и RrA<sub>E149R,V150P,F151T</sub> обладающих различной цитотоксической активностью и способностью подавлять экспрессию hTERT субъединицы теломеразы и активность теломеразы как *in vitro*, так и *in vivo* [12, 13, 14].

### Выделение и очистка RrA вариантов

При последовательной хроматографии бесклеточных экстрактов на колонках с Q-Sepharose и DEAE-Toyopearl 650m происходило удаление большей части балластных белков; хотя при этом терялось около 10% целевого белка, удельная активность фермента возрастала примерно в 7–8 раз, составляя около 170, 135, 140 и 130 МЕ/мг белка для вариантов RrA<sub>17N,K149E</sub>, RrA<sub>E149R,V150P</sub>, RrA<sub>17N,E149R,V150P</sub> и RrA<sub>E149R,V150P,F151T</sub> соответственно. Видно, что внесенные точечные мутации несколько снижают удельную активность фермента.

### Молекулярная масса и чистота мутантных форм RrA

Определение молекулярной массы и степени чистоты целевого белка проводили с помощью электрофореза в 12%-ном ДСН-ПААГ по методу Laemmli. На электрофореграмме очищенных препаратов выявлялись полосы в области 21 кДа для вариантов RrA<sub>17N,K149E</sub>, RrA<sub>17N,E149R,V150P</sub> и 18 кДа для вариантов RrA<sub>E149R,V150P</sub>, RrA<sub>E149R,V150P,F151T</sub> (рис. 1). По



**Рисунок 1.** Электрофорез очищенных препаратов мутантных форм RrA в 12%-ном ДСН-ПААГ. М – маркер молекулярных масс; 2 – RrA<sub>17N,K149E</sub> 9 мкг; 3 – RrA<sub>17N,E149R,V150P</sub> 20 мкг; 4 – RrA<sub>E149R,V150P</sub> 16 мкг; 5 – RrA<sub>E149R,V150P,F151T</sub> 18 мкг.

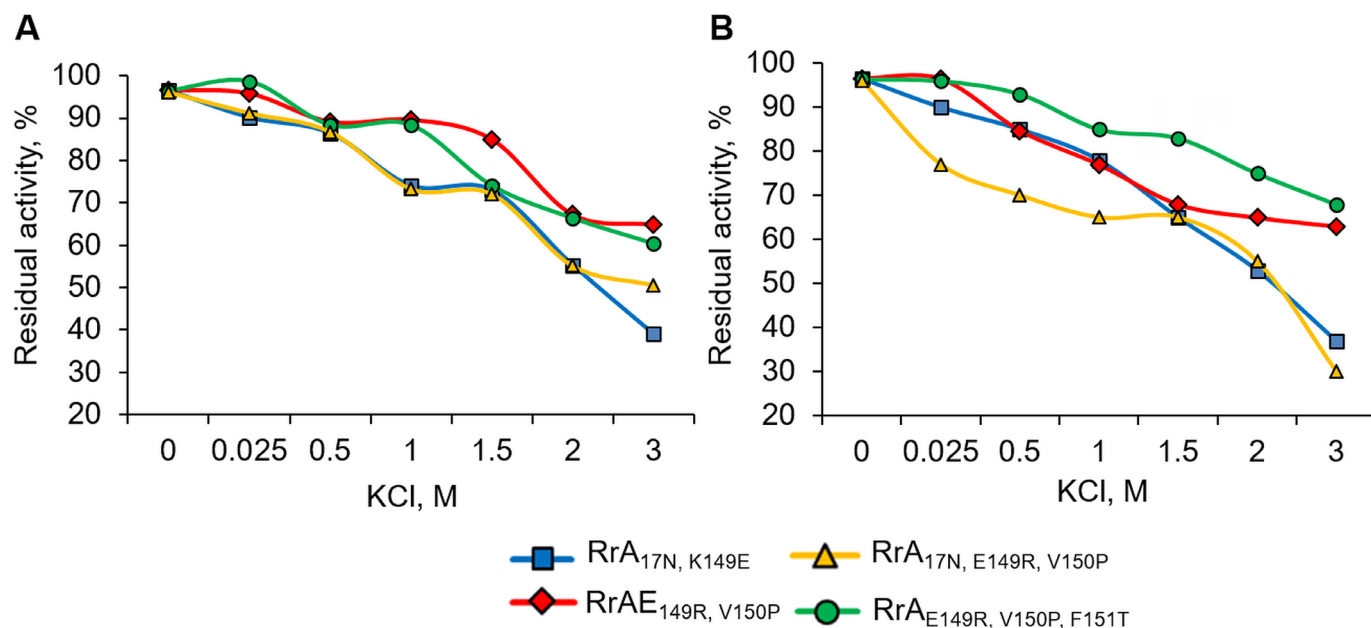
результатам обработки данных электрофореза с помощью программы Gel-Proanalyzer 3.1.00.00 («MediaCybernetics», США) чистота целевых белков составила не менее 82%.

### Субстратная специфичность вариантов RrA

Изучение субстратной специфичности мутантных форм RrA проводили в стандартных условиях. Концентрация субстратов составляла 10–170 мМ в 0.1 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>–NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> буфере (pH 7.4). Все изученные варианты RrA, снижающие активность теломеразы, сохраняли сходную способность гидролизовать L-аспарагин, как и варианты, не проявляющие антителомеразного действия – RrA<sub>17N,D60K,F61L</sub> и RrA<sub>17N,A64V,E67K</sub> [12, 14]. Незначительная активность при использовании D-аспарагина и L-глутамина в качестве субстратов составляла не более 1.6% и 0.1% от L-аспарагиназной, соответственно. Есть сообщения, что снижение L-глутаминазной активности у мутантов EcA и EgA сопровождалось уменьшением L-аспарагиназной активности; у мутантов L-аспарагиназы *Helicobacter pylori* (HpA) L-аспарагиназная активность сохранялась, но при этом отсутствовало цитотоксическое действие на HL-60 клетки [20, 21]. Низкая L-глутаминазная активность (не более 1%) известна лишь у небольшого числа бактериальных L-аспарагиназ [10, 22, 23, 24].

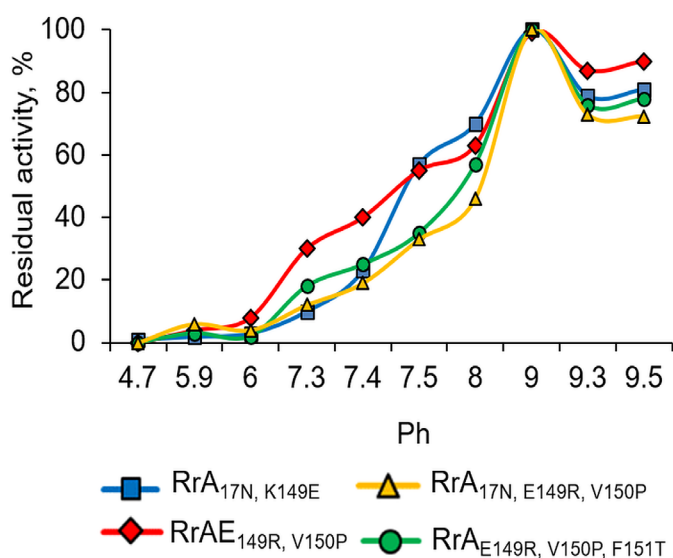
### Зависимость активности мутантных вариантов RrA от ионной силы

В отличие от полноразмерных L-аспарагиназ HpA и EcA и др., все варианты RrA проявляли выраженную зависимость активности от концентрации KCl в 0.1 М Na-фосфатном буфере или 0.01 М карбонатном буфере (pH 7.4). При увеличении концентрации KCl от 0 до 3.0 М в инкубационной среде активность всех мутантных форм



**Рисунок 2.** Зависимость активности L-аспарагиназы вариантов RrA от ионной силы в 0.1 М Na-фосфатном буфере pH 7.4 (A) и в 0.01 М NaHCO<sub>3</sub> буфере pH 7.4 (B).

RrA пропорционально снижалась (рис. 2), что согласуется с нашими предыдущими данными [12].



**Рисунок 3.** Зависимость активности L-аспарагиназы вариантов RrA от pH.

Зависимость активности всех вариантов RrA от ионной силы раствора указывает на преобладание электростатических взаимодействий в связывании молекул субстрата в активном центре и/или в стабилизации ферментного комплекса.

#### Влияние pH на ферментативную активность вариантов RrA

Зависимость активности вариантов RrA от pH среды изучали в разных стандартных буферных системах: натрий-ацетатной (pH 3.0–6.0), натрий-фосфатной (pH 6.0–8.0), Tris-HCl (pH 7.0–9.0) и боратной (pH 9.0–11.0) (рис. 3.).

Как видно из рисунка 3, зависимость активности L-аспарагиназы у всех изученных вариантов от pH была почти идентичной и имела куполообразную форму. Оптимум pH наблюдался в зоне значений 8.5–9.0. Введенные в целевой белок замены расположены вдали от активного центра [12], чем можно объяснить отсутствие различий в  $pH_{opt}$  у исследованных вариантов RrA с различной антителомеразной активностью. При физиологическом значении pH 7.4 L-аспарагиназная активность RrA составляла 30–40% от максимальной и практически исчезала при pH 6.0. В то же время большинство известных рекомбинантных полноразмерных микробных L-аспарагиназ, в том числе используемых в медицине, имеют pH оптимум в более широком интервале (4.0–11.0) [23–27]. Следовательно, проявление антипролиферативных (антителомеразных) свойств мутантных форм RrA не связано с увеличением L-аспарагиназной активности при физиологических значениях pH.

#### Влияние ионов металлов и некоторых реагентов на активность мутантных форм RrA

Одной из важных характеристик ферментов является их чувствительность к воздействию ионов металлов, компонентов буферных растворов и специфических реагентов, что дает представление об оптимальных условиях проявления ферментативной активности и важности для катализа тех или иных функциональных групп белковой молекулы. В таблице 1 приведены результаты влияния некоторых металлов и реагентов на активность мутантных форм RrA. Ионы K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Co<sup>2+</sup> существенно не влияли на активность L-аспарагиназы. Ионы Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> снижали активность на 50–60%, а KMnO<sub>4</sub> – на 80%. Ионы Mg<sup>2+</sup> стимулировали активность фермента на 30%. Разнонаправленный эффект ионов металлов на активность различных L-аспарагиназ [23, 28, 29] может быть связан с их влиянием на образование фермент-субстратного комплекса или на структуру белковой молекулы. Обнаружение участка

**Таблица 1.** Влияние ионов металлов и некоторых реагентов на активность L-аспарагиназы мутантных форм RrA

| Reagent           | (mM) | % residual activities | Reagent           | (mM) | % residual activities |
|-------------------|------|-----------------------|-------------------|------|-----------------------|
| KCl               | 10   | 79-91                 | KMnO <sub>4</sub> | 2    | 14-18                 |
| CaCl <sub>2</sub> | 10   | 79-83                 | CoCl <sub>2</sub> | 2    | 78-86                 |
| ZnCl <sub>2</sub> | 10   | 79-88                 | Iodacetamide      | 1    | 100                   |
| CuCl <sub>2</sub> | 10   | 35-42                 | PMSF              | 5    | 100                   |
| CsCl              | 10   | 90-94                 | EDTA              | 5    | 100                   |
| FeCl <sub>3</sub> | 5    | 33-37                 | 2-mercaptoethanol | 0.5  | 125-130               |
| MnCl <sub>2</sub> | 5    | 54-59                 | GSH               | 1    | 139-143               |
| MgCl <sub>2</sub> | 2    | 129-133               | NaN <sub>3</sub>  | 5    | 118-121               |

**Примечание:** Опыты проводили в 0.1 М Na-фосфатном pH 7.4 и 0.1 М Tris-буфере pH 8.5. Время инкубации с реагентом – 30 минут при 4°C.

связывания цинка в бактериальных L-аспарагиназах II типа *Escherichia coli* (EcAII) предполагает влияние металлов на противоопухолевую активность и иммунологический ответ [30].

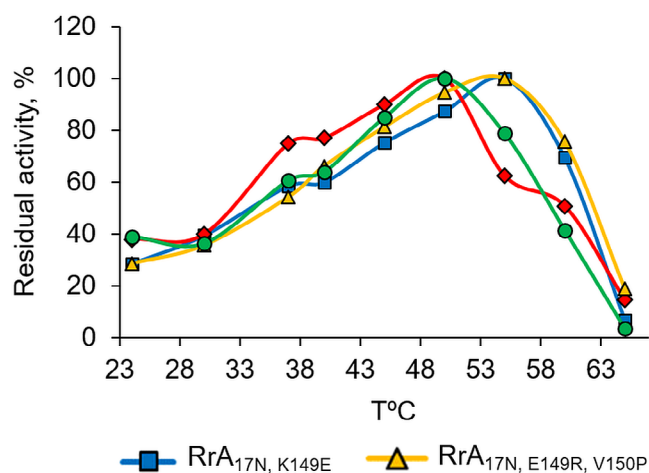
Подобно другим L-аспарагиназам, мутантные формы RrA, проявляющие также антителомерный эффект, не являются металлозависимыми (проба с ЭДТА), не содержат SH-групп (проба с иодацетамидом), остатки серина (проба с PMSF) и цистеина (пробы с иодацетамидом и меркаптоэтанолом) в активном центре. Возможно, в активном центре присутствует карбоксильная группа (проба с KMnO<sub>4</sub>).

Tris и его аналоги выступают в роли лигандов-эффекторов. Присоединение такого лиганда к аллостерическому центру изменяет третичную и/или четвертичную структуру молекулы фермента и, соответственно, конфигурацию его активного центра, вызывая изменение стабильности или ферментативной активности.

#### Влияние температуры на активность вариантов RrA

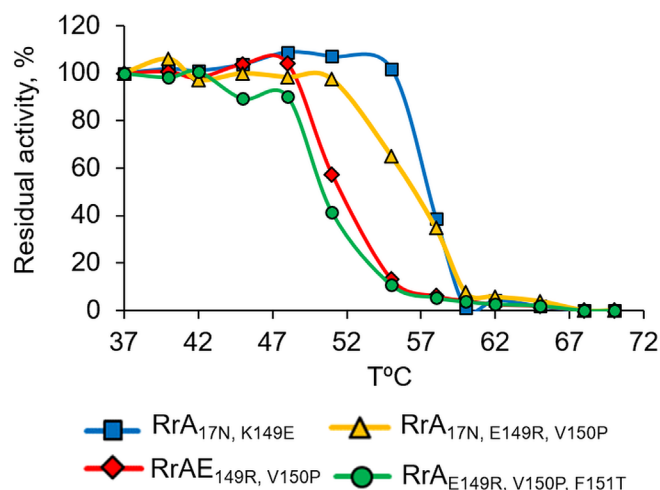
Влияние температуры на активность вариантов RrA изучали в диапазоне 20–70°C в Na-фосфатном буфере при физиологических значениях pH 7.4.

Как видно из рисунка 4, варианты RrA<sub>17N, E149R, V150P</sub> и RrA<sub>E149R, V150P, F151T</sub> максимально подавляющие активность теломеразы (до 15% от исходного уровня) [12], имеют различный температурный оптимум. Варианты RrA, не влияющие на активность теломеразы (RrA<sub>17N, D60K, F61L</sub> и RrA<sub>17N, A64V, E67K</sub>) [12], также различаются по T<sub>опт</sub> (58°C и 53°C, соответственно). Сдвиг T<sub>опт</sub> с 56°C для RrA<sub>17N, 149E</sub> и RrA<sub>17N, E149R, V150P</sub> до 50°C для вариантов RrA<sub>E149R, V150P, F151T</sub> и RrA<sub>E149R, V150P</sub> возможно, определяется наличием или отсутствием дополнительной последовательности 17N. При физиологической температуре 37°C L-аспарагиназная активность составляла ~50–60% от максимальной. Повышение температуры выше 57°C приводило к резкому падению активности фермента вплоть до полной инактивации при 65°C всех вариантов RrA.

**Рисунок 4.** Влияние температуры на активность L-аспарагиназы вариантов RrA.

Интересно, что активность всех вариантов RrA зависела от состава буферного раствора. Так, при pH 7.4 в 0.1 М Na-фосфатном буфере активность L-аспарагиназ была примерно в 2 раза ниже, чем в 0.1 М Tris-HCl буфере. Эти различия усиливались при повышении pH до 9.2.

По данным литературы, Tris способен увеличивать термодинамическую стабильность и активность некоторых функциональных белков и вовлекаться в ферментативные реакции, влияя на сайты связывания ферментов с металлами и, следовательно, на сродство к субстрату и каталитическую активность [31]. При этом возможно взаимодействие Tris с определённым белковым мотивом и формирование так называемого «кармана», являющегося своеобразным аллостерическим центром, в то время как

**Рисунок 5.** Термостабильность L-аспарагиназы мутантных вариантов RrA.



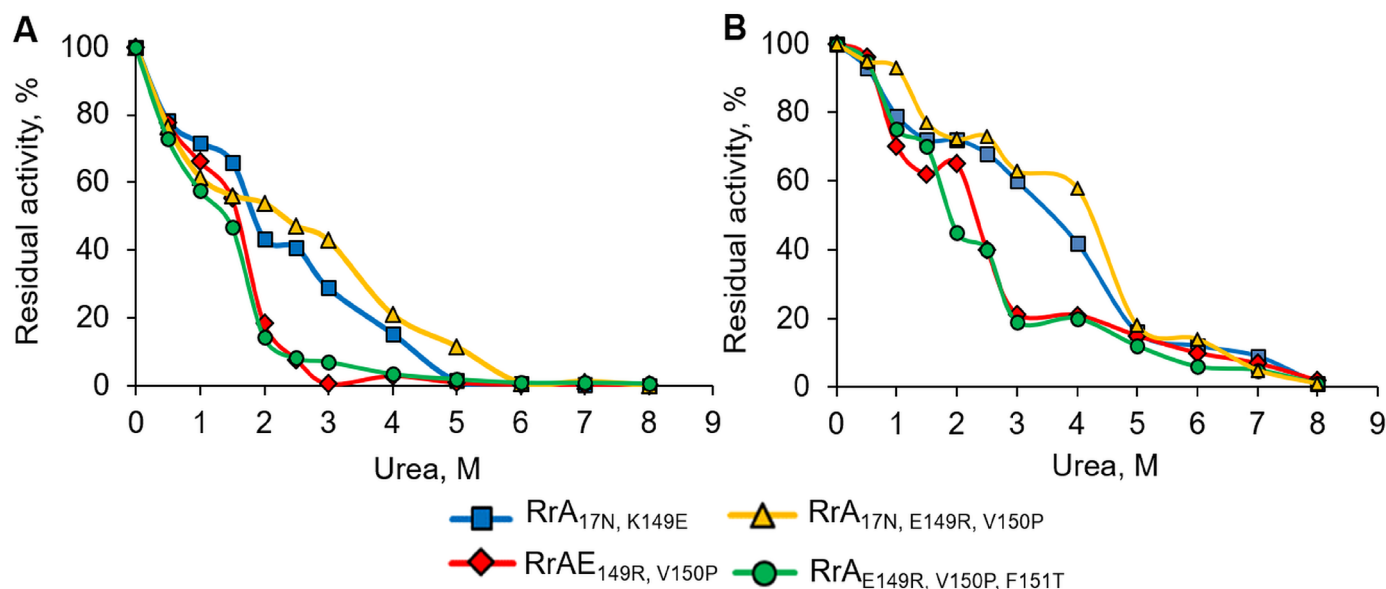


Рисунок 6. Денатурация вариантов RrA в растворе мочевины, pH 7.4 (A) и pH 9.2 (B).

#### Термостабильность вариантов L-аспарагиназы RrA

Оптимальная температура действия фермента тесно связана с его термостабильностью. Мутантные формы RrA инкубировали в 0.1 М К-фосфатном буфере (pH 7.4) при различных температурах в течение 10 мин, после чего определяли активность фермента. Как видно из рисунка 5, прогревание до температуры 47°C практически не влияло на активность рекомбинантных вариантов RrA, что согласуется с предыдущими исследованиями.

Значение  $T_{50}$  для RrA<sub>17N, K149E</sub> и RrA<sub>17N, E149R</sub> составляет 57–58°C, а для RrA<sub>E149R, V150P</sub> и RrA<sub>E149R, V150P, F151T</sub> – 51°C. При этом наибольшее снижение L-аспарагиназной активности наблюдалось в интервале температур от 52°C до 60°C. После 10 мин прогревания при 62°C все мутантные формы RrA почти полностью инактивировались.

Зависимость активности фермента RrA от температуры аналогична таковой для препаратов, применяемых в клинической практике, однако, EcA и EгA а также YpA и др. более стабильны при повышенных температурах [25, 32].

L-аспарагиназная активность мутантных форм RrA сохранялась на уровне >95% от начальной в течение 3 сут. при температуре от 4°C до 37°C. Мутанты RrA были стабильны в течение 16 мес. при -20–70°C в 10 мМ К-фосфатном буфере, содержащем 1 М глицин, 1 мМ ЭДТА, 0.28 М KCl и 0.5% глюкозу. После 20 циклов замораживания-оттаивания все изученные мутантные формы RrA сохраняли не менее 80% исходной L-аспарагиназной активности. Стабильность RrA была аналогичной стабильности EcA и HрA, однако EгA была менее устойчива при замораживании-оттаивании [25, 32]. Стабильность RrA резко возрастала после лиофилизации.

#### Влияние химической денатурации на стабильность вариантов RrA

Исследована устойчивость вариантов RrA к денатурации в растворе мочевины в концентрации от 0 до 8 М в 0.1 М Na-фосфатном буфере при pH 7.4 и 9.2 (рис. 6).

При инкубации RrA в течение 1 ч с 0–3 М мочевиной

при pH 7.4 обнаружено резкое снижение L-аспарагиназной активности. Так, в присутствии 2 М мочевины активность вариантов RrA<sub>17N, K149E</sub> и RrA<sub>17N, E149R, V150P</sub> снижалась на 50%, а RrA<sub>E149R, V150P</sub> и RrA<sub>E149R, V150P, F151T</sub> на 80% от исходной. При возрастании концентрации мочевины до 6 М фермент полностью инактивировался.

Повышение pH до 9.2 оказывало стабилизирующее действие на целевой белок. Как и при физиологических значениях pH 7.4, варианты RrA<sub>17N, K149E</sub> и RrA<sub>17N, E149R, V150P</sub> были более стабильными, чем RrA<sub>E149R, V150P</sub> и RrA<sub>E149R, V150P, F151T</sub>. Инактивация RrA<sub>17N, K149E</sub> и RrA<sub>17N, E149R, V150P</sub> на 50% наблюдалась при концентрации мочевины 4 М, в то время как RrA<sub>E149R, V150P</sub> и RrA<sub>E149R, V150P, F151T</sub> в этих условиях теряли 80% активности. Полная инактивация всех вариантов RrA при pH 9.2 происходила в 7–8 М растворе мочевины.

Из представленных результатов очевидно, что присутствие фрагмента 17N в составе мутантных вариантов RrA<sub>17N, K149E</sub> и RrA<sub>17N, E149R, V150P</sub> и RrA<sub>17NN, D60K, F61L</sub> [12] придает им большую стабильность по отношению не только к термоденатурации, но и к химической денатурации. В то же время взаимосвязи между устойчивостью к химической денатурации и способностью подавлять активность теломеразы не наблюдалось.

В отличие от RrA, полноразмерные L-аспарагиназы HрA и EгA и др. стабильны в присутствии 3 М мочевины при pH 7.4 [25, 32]. Мочевина не приводит к денатурации L-аспарагиназы из *Pyrococcus furiosus*, и инактивация фермента наблюдается только в присутствии гуанидингидрохлорида [24]. Повышенная чувствительность L-аспарагиназной активности RrA к присутствию даже 1 М мочевины при pH 7.4 указывает на слабые водородные связи в белке и важность его структурной организации для функционирования фермента.

#### Кинетические свойства вариантов RrA

В 0.1 М К-фосфатном буфере (pH 7.4) значения  $K_m$  для L-аспарагина у мутантных форм в различной степени подавляющих теломеразную активность: RrA<sub>17N, K149E</sub>, RrA<sub>E149R, V150P</sub>, RrA<sub>17N, E149R, V150P</sub> и RrA<sub>E149R, V150P, F151T</sub>

отличаются незначительно и составляют соответственно  $0.413 \pm 0.180$  мМ;  $0.501 \pm 0.210$  мМ;  $0.385 \pm 0.122$  мМ;  $0.348 \pm 0.143$  мМ. Наименьшим значением  $K_m$   $0.237 \pm 0.07$  мМ в фосфатном буфере из всех мутантных форм RrA обладает RrA<sub>17N,D60K,F61L</sub> [12], однако она не влияет на теломеразную активность [14].

В 0.1 М боратном буфере pH 9.2 соответствующие величины  $K_m$  (мМ) для L-аспарагина были несколько ниже ( $0.250 \pm 0.098$  мМ;  $0.227 \pm 0.087$  мМ;  $0.287 \pm 0.156$  мМ;  $0.181 \pm 0.087$  мМ), что указывает на большее сродство ферментов к субстрату. Близость значений  $K_m$  у различных мутантных форм RrA может объясняться отдаленностью районов мутаций от участков белковой молекулы, участвующих в ферментативном катализе.

Значения  $V_{max}$  (мМ/мин) в отношении L-аспарагина у мутантных форм RrA<sub>17N,K149E</sub>, RrA<sub>E149R,V150P</sub>, RrA<sub>17N,E149R,V150P</sub>, RrA<sub>E149R,V150P,F151T</sub> были выше в 2 раза при pH 9.2 в боратном буфере (соответственно  $43.29 \pm 8.19$  мМ;  $44.98 \pm 11.03$  мМ;  $39.33 \pm 7.89$  мМ;  $42.24 \pm 8.56$  мМ), чем в К-фосфатном pH 7.4 ( $22.82 \pm 7.67$  мМ;  $38.07 \pm 10.12$  мМ;  $17.72 \pm 9.45$  мМ;  $18.94 \pm 8.99$  мМ соответственно).

Величину  $K_m$  для L-глутамина вариантов RrA определить методом прямой несслеризации не представлялось возможным ввиду низкой активности L-глутаминазы.

Антипролиферативное действие бактериальных аспарагиназ, применяемых в клинической практике (ЕсА и ЕгА), связывают со способностью гидролизовать L-аспарагин. [2, 3, 4]. Следовательно, чем выше сродство фермента к субстрату, характеризующееся константой Михаэлиса, тем эффективнее противоопухолевый препарат. Все бактериальные L-аспарагиназы в настоящее время принято разделять на два основных типа [33, 34]: цитоплазматические ферменты 1 типа, характеризующиеся высокой  $K_m$  ( $10^{-3}$  М) для L-аспарагина, не оказывающие противоопухолевое действие (*Bacillus subtilis*, *Pyrococcus horikoshii* и др. [24, 26]), и периплазматические 2 типа, обладающие противоопухолевой активностью и имеющие высокое сродство к аспарагину ( $K_m$   $10^{-5}$  М), например, применяемые в клинической онкологии ЕсА и ЕгА [1, 32, 33].

Особенностью рекомбинантной RrA и ее мутантных форм, роднящей ее с внутриклеточными L-аспарагиназами 1 типа, является достаточно низкое сродство к субстрату ( $K_m \sim 0.3 - 0.5$  мМ) и крайне малая L-глутаминазная активность, не зависящая от внесенных в белок мутаций (не более 0.1% от L-аспарагиназной).

В противоположность существующим представлениям об отсутствии антипролиферативного эффекта у внутриклеточных L-аспарагиназ, полученные нами ранее данные позволяют утверждать, что некоторые внутриклеточные L-аспарагиназы, независимо от таксономических характеристик, все же проявляют антипролиферативное действие [10, 12, 14].

#### Расчетные характеристики целевого белка

Индекс GRAVY, равный  $-0.041 - 0.072$ , свидетельствует о хорошей растворимости данного белка в водных растворах. Алифатический индекс, равный  $85.24 - 93.08$ , характеризует RrA как средне термостабильную белковую молекулу. Индекс нестабильности характеризует фрагмент 17N как нестабильный, однако, по нашим данным, он придает

стабильность всей молекуле фермента.

Изоэлектрическая точка вариантов RrA находилась в пределах 5.37–5.93. Заметим, что pI 5.37 RrA<sub>A3730</sub> L-аспарагиназы из природного штамма и вариантов RrA<sub>E149R,V150P</sub> и RrA<sub>E149R,V150P,F151T</sub> несколько выше клонированного нами RrA<sub>K149E</sub> (pI 5.05), что объясняется заменой положительно заряженного Lys на отрицательно заряженную Glu в положении 149. Наличие фрагмента 17N в составных вариантах RrA<sub>17N,K149E</sub>, RrA<sub>17N,E149R,V150P</sub> повышало pI до 5.40 и 5.93 соответственно.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По степени возрастания ингибирования активности теломеразы (и антипролиферативной активности) варианты RrA можно расположить в следующей последовательности: RrA<sub>17N,D60K,F61L</sub> и RrA<sub>17N,A64V,E67K</sub> (0%) < RrA<sub>E149R,V150P</sub> (20%) < RrA<sub>17N,K149E</sub> (80%) < RrA<sub>E149R,V150P,F151T</sub> (83%) < RrA<sub>17N,E149R,V150P</sub> (85%) [14]. Однако соответствующих различий в кинетических свойствах, зависимости активности от ионной силы и значения оптимума pH у всех изученных мутантных форм L-аспарагиназ RrA не наблюдалось. Это можно объяснить тем, что внесенные в молекулу RrA аминокислотные замены 17N, E149R, V150P, F151T, влияющие на активность теломеразы, не затрагивают активный сайт фермента. Более того, вариант RrA<sub>17N,D60K,F61L</sub> имеет лучшие кинетические свойства и стабильность [12], но не влияет на активность теломеразы.

Противоопухолевое действие мутантов RrA ниже, чем L-аспарагиназы ЕсА, что, вероятнее всего, связано с отличающимся на порядок значением  $K_m$  или объясняется повышенной чувствительностью вариантов RrA к неоптимальным физиологическим значениям pH и температуры по сравнению с ЕсА.

Варианты RrA не являются металлозависимыми, не содержат SH-групп, остатков серина и цистеина в активном центре. Вероятно, в активном центре присутствует карбоксильная группа. В отличие от ЕсА и ЕгА, на активность RrA влияет состав буферного раствора. При использовании 0.1 М Na-фосфатного буфера активность была примерно в 2 раза ниже, чем в 0.1 М Tris-HCl (pH 7.4) буфере. Различия усиливаются при повышении pH до 9.2.

Вопреки предположению о том, что фрагмент 17N (MASMTGGQQMGRGSSSRQ) слишком мал, чтобы влиять на целевой белок [10], присутствие в структуре вариантов RrA этой последовательности придает им большую устойчивость как к термоденатурации, так и к денатурации мочевиной. Например, в присутствии 2 М мочевины в 0.1 М К-фосфатном буфере (pH 7.4) наблюдается потеря 50% от исходной активности вариантов RrA<sub>17N,K149E</sub>, RrA<sub>17N,E149R,V150P</sub> и потеря 80% исходной активности вариантов RrA<sub>E149R,V150P</sub>, RrA<sub>E149R,V150P,F151T</sub>. Структурные различия проявляются также в сдвиге температурного оптимума с 56°C для вариантов, несущих дополнительный фрагмент 17N, RrA<sub>17N,K149E</sub>, RrA<sub>17N,E149R,V150P</sub> до 50°C для вариантов RrA<sub>E149R,V150P</sub>, RrA<sub>E149R,V150P,F151T</sub> у которых этот фрагмент отсутствует.

Если усиление цитотоксических (антипролиферативных) свойств мутантных форм RrA<sub>17N,K149E</sub>, RrA<sub>17N,E149R,V150P</sub> можно связать со стабилизирующим действием фрагмента 17N, то подавление пролиферации вариантами RrA<sub>E149R,V150P</sub>, RrA<sub>E149R,V150P,F151T</sub> требует другого объяснения. Возможно, что способность некоторых мутантных форм белка RrA<sub>A3730</sub>

снижать экспрессию каталитической субъединицы hTERT и, следовательно, активность теломеразы одновременно с удалением L-аспарагина из среды, является причиной усиления их антипролиферативных свойств.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность к.б.н. Беляевой Наталье Федоровне (Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича) за участие в обсуждении результатов и Василию Николаевичу Лазареву (ФНКЦ физико-химической медицины) за секвенирование ДНК.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы и частичной финансовой поддержке РФФИ (грант №15–34–70020).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## ЛИТЕРАТУРА

- Hill, J. M., Roberts, J. E., Loeb, E., Khan, A., MacLellan, A., Hill, R. W. (1967). L-asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms. Remission in human leukemia. J. Amer. Med. Ass., **202**(9), 882–888.
- Oettgen, H. F., Old, L. J., Boyse, E. A., Campbell, H. A., Phillips, F. S., Clarkon, B. D., Tallal, L., Leeper, R.D., Schwartz, M.K., Kim, L.H. (1967). Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. Cancer Res., **27**(12), 2619–2631.
- Lazarus, H., McCoy, T. A., Farber, S., Barell, E. F., Foley, G. E. (1969). Nutritional requirements of human leukemic cells. Asparagine requirements and the effect of L-asparaginase. Exp. Cell Res., **57**, 134 – 138.
- Ueno, T., Ohtawa, K., Mitsui, K., Koda, Y., Hiroto, M., Matsushima, A., Inada, Y., Nishimura, H. (1997). Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. Leukemia, **11**, 1858–1861.
- Ollenschläger, G., Roth, E., Linkesch, W., Jansen, S., Simmel, A., Mödder, B. (1988). Asparaginase-induced derangements of glutamine metabolism: the pathogenetic basis for some drug-related side-effects. Eur. J. Clin. Invest., **18**(5), 512–516.
- Offman, M. N., Krol, M., Patel, N., Krishnan, S., Liu, J., Saha, V., Bates, P.A. (2011). Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. Blood, **117**(5), 1614–1621. DOI: 10.1182/blood-2010-07-298422
- Blackburn E.H. (2000). Telomere states and cell fates. Nature, **408** (6808), 53–56. DOI: 10.1038/35040500
- Kim N. W., Piatyszek M. A., Prowse K. R., Harley C. B., West M. D., Ho P. L. C., Oviello G. M., Wright W. E., Weinrich S. L., Shay J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science, **266** (5193), 2011–2015.
- Marian C.O., Cho S.K., McEllin B.M., Maher E.A., Hatanpaa K.J., Madden C.J. Mickey B.E., Wright W.E., Shay J.W., Bachoo R.M. (2010). The telomerase antagonist, imetelstat, efficiently targets glioblastoma tumor-initiating cells leading to decreased proliferation and tumor growth. Clin. Cancer Res., **16**(1), 154–163. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2850.
- Pokrovskaya, M. V., Pokrovsky, V. S., Aleksandrova, S. S., Anisimova, N. I., Adrianov, R. M., Treshchalina, E. M., Ponomarev, G. V., Sokolov, N. N. (2012). Recombinant intracellular Rhodospirillum rubrum L-asparaginase with low L-glutaminase activity and antiproliferative effect. Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, **6** (2), 123–131. DOI: 10.1134/S1990750812020096
- Studier, F. W., Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol., **189**(1), 113–130.
- Pokrovskaya, M. V., Aleksandrova, S. S., Pokrovsky, V. S., Veselovsky, A. V., Grishin, D. V., Abakumova, O. Yu., Podobed, O. V., Mishin, A. A., Zhdanov, D. D., Sokolov, N. N. (2015). Identification of Functional Regions in the Rhodospirillum rubrum L-Asparaginase by Site-Directed Mutagenesis. Molecular Biotechnology. Mol. Biotechnol., **57**(3), 251–264. DOI: 10.1007/s12033-014-9819-0
- Pokrovsky, V.S., Anisimova, N.Yu., Pokrovskaya, M.V., Alexandrova, S.S., Sokolov, N.N., Treshchalina, E.M. Antiproliferative activity of recombinant l-asparaginase Rhodospirillum rubrum. J. of N. N. Blokhin RCRC **4**(22)24–31.
- Pokrovskaya, M. V., Zhdanov, D. D., Eldarov, M. A., Aleksandrova, S. S., Veselovsky, A. V., Pokrovsky, V. S., Grishin, D. V., Gladilina, Y. A., Sokolov, N. N. (2017). Suppression of telomerase activity in leukemic cells by mutant forms of Rhodospirillum rubrum L-asparaginase. Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry, **11**(3), 219–233. DOI: 10.1134/S1990750817030088
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, **74**(12), 5463–5467.
- Sedmak, J. J., Grossberg, S. E. (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. Anal. Biochem., **79**(1), 544–552.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, **227**, 680–685.
- Wriston, J. C., Yellin, T. O. (1973). L-Asparaginase: a review. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology. Adv. Enzymol., **39**, 185–248.
- Gaffar, S. A., Shethna, Y. I. (1977). Purification and some biological properties of asparaginase from Azotobacter vinelandii. App. and Environmental Microbiol., **33**(3), 508–514.
- Maggi, M., Chiarelli, L. R., Valentini, G., Scotti, C. (2015). Engineering of Helicobacter pylori L-Asparaginase: Characterization of Two Functionally Distinct Groups of Mutant. PLoS One **10**(2); e0117025. DOI: 10.1371/journal.pone.0117025
- Derst, C., Henseling, J., Rohm, K. H. (2000). Engineering the substrate specificity of Escherichia coli asparaginase. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. Protein Sci. **9**(10), 2009–2017. DOI: 10.1110/ps.9.10.2009
- Distasio, J. A., Salazar, A. M., Nadj, M., Durden, D. L. (1982). Glutaminase-free asparaginase from vibrio succinogenes: an antilymphoma enzyme lacking hepatotoxicity. Int. J. Cancer. **30**(3), 343–347.
- Goswami, R., Hegde, K., Veeranki, D. V. (2014) Batch, Fed Batch Production and Characterization of Glutaminase free L-Asparaginase 11 of Pectobacterium carotovorum MTCC1428 in Escherichia coli. Adv. Microbiology, **4**(10), 667–680. DOI: 10.4236/aim.2014.410072
- Bansal, S., Gnaneswari, D., Mishra, P., Kundu, B. (2010) Structural stability and functional analysis of L-asparaginase from Pyrococcus furiosus. Biochemistry (Moscow), **75**(3), 375–381.
- Pokrovsky, V.S., Pokrovskaya, M.V., Aleksandrova, S.S., Andrianov, R.M., Zhdanov, D.D., Omel'ianiuk, N.M., Treshchalina, E.M., Sokolov, N.N. (2013). Physico-chemical properties and antiproliferative activity of recombinant Yersinia pseudotuberculosis L-asparaginase. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. **49**(1), 24–28.
- Jia, M., Xu, M., He, B., Rao, Z. (2013). Cloning, expression and characterization of L-asparaginase from a newly isolated Bacillus subtilis B11-06. J. Agric. Food Chem. **61**, 9428–9434. DOI: 10.1021/jf402636w
- Libinson, G. S., Mikhalev, A. V. (1976). Relationship between the magnitude of Km and pH for L-asparaginase. Biochemistry, **41**(1), 149–152.
- Moreno-Enriquez, A., Evangelista-Martinez, Z., Gonzalez-Mondragon, E. G., Calderon-Flores, A., Arreguin, R., Perez-Ruedas, E., Huerta-Saquero, A. (2012). Biochemical Characterization of Recombinant L-Asparaginase (AnsA) from Rhizobium etli, a Member of an Increasing Rhizobial-Type Family of L-Asparaginases. J. Microbiol. Biotechnol., **22**(3), 292–300.
- Mahajan, R. V., Kumar, V., Rajendran, V., Saran, S., Ghosh, P. C., Saxena, R. K. Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-glutaminase activity from Bacillus licheniformis: in vitro evaluation of anti-cancerous properties. (2014). Plos One, **9**(6) e99037.
- Borek, D., Kozak, M., Pei, J., Jaskolski, M. (2014). Production and characterization of glutaminase free L-Asparaginase 11 of Pectobacterium carotovorum MTCC1428 in Escherichia coli. FEBS Journal Special Issue: Celebrating the International Year of Crystallography, **281**(18), 4097–4111. DOI: 10.1371/journal.pone.0099037
- Hethey, J., Lai J., Loutet, S., Martin, M., Vincent, T. (2002). Effects of Tricine, Glycine and Tris Buffers on Alkaline Phosphatase Activity. J. Exp. Microbiology and Immunology, **2**, 33–38.
- Gervais, D., Foote, N. (2014). Recombinant deamidated mutants of Erwinia chrysanthemi L-asparaginase have similar or increased activity compared to wild-type enzyme. Mol. Biotechnol., **56**(10), 865–877. DOI: 10.1007/s12033-014-9766-9
- Sanches, M., Krauchenco, S., Polikarpov, I. (2007). Structure, substrate



complexation and reaction mechanism of bacterial asparaginases. Current Chemical Biology, 1(1), 75–86. DOI: 10.2174/187231307779814057

34. Cedar, H., Schwartz, J. H. (1968). Localization of the two L-asparaginases in anaerobically grown Escherichia coli. J. Biol. Chem., 242, 3753–3755.

Поступила: 03.09.2018

После доработки: 26.01.2019

Принята к публикации: 07.02.2019

# PHYSICAL-CHEMICAL PROPERTIES OF L-ASPARAGINASE MUTANTS FROM *RHODOSPIRILLUM RUBRUM* WHICH SHOWED ANTITELOMERASE ACTIVITY

*M.V. Pokrovskaya<sup>1\*</sup>, S.S. Aleksandrova<sup>1</sup>, A.V. Veselovsky<sup>1</sup>, D.D. Zdanov<sup>1,2</sup>, V.S. Pokrovsky<sup>1,2</sup>, M.A. Eldarov<sup>3</sup>, D.V. Grishin<sup>1</sup>, Yu. A. Gladilina<sup>1</sup>, I.Yu. Toropigin<sup>1</sup>, N.N. Sokolov<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \* email: ivan1190@yandex.ru

<sup>2</sup>Peoples Friendship University of Russia, 6 Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198 Russia

<sup>3</sup>Research Center of Biotechnology RAS, 33 Leninsky Prospect, Moscow, 119071 Russia

Rru\_A3730 protein is a bacterial *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase (RrA), which is known by its anticancer activity. RrA variants with point amino acid substitutions in the region of 150 amino acids residues: RrA<sub>N17, K149E</sub>, RrA<sub>E149R, V150P, F151T</sub>, RrA<sub>N17, E149R, V150P</sub>, RrA<sub>E149R, V150P</sub> showed antiproliferative properties, and also by their ability to suppress telomerase activity. This work is devoted to comparison of physical-chemical and catalytic properties of these mutant forms of RrA. It is shown that pH optimum is in the alkaline zone (8.5–9.3); L-glutaminase and D-asparaginase activity is respectively not more than 0.1% and 1.6% of L-asparaginase for all studied variants of RrA. The presence of the N17-terminal amino acid sequence MASMTGGQMGRGSSRQ of the capsid protein of bacteriophage T7 in the RrA structure leads to an increase in the thermal stability of mutant RrA analogues (from 50°C to 56°C) and their resistance to denaturation in the presence of 3–4 M urea. It is of Metal ions exhibit multidirectional effects on L-asparaginase activity of RrA. K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Co<sup>2+</sup> in significantly affect the activity of L-asparaginase, while Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> ions inhibit it. There was no correlation between antitelomerase (antiproliferative) activity and kinetic properties of mutant forms of L-asparaginase RrA.

**Key words:** L-asparaginase *Rhodospirillum rubrum*; site-directed mutagenesis; physical-chemical properties

