

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ L-АСПАРАГИНАЗ ЭКСТРЕМОФИЛОВ

© 2021 г. М. В. Думина<sup>1,\*</sup>, А. А. Жгун<sup>1</sup>, М. В. Покровская<sup>2</sup>,  
С. С. Александрова<sup>2</sup>, Д. Д. Жданов<sup>2</sup>, Н. Н. Соколов<sup>2</sup>, М. А. Эльдаров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН,  
Москва, 117312 Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, 119121 Россия

\*e-mail: DuminaMaria@gmail.com

Поступила в редакцию 07.04.2021 г.

После доработки 22.04.2021 г.

Принята к публикации 23.04.2021 г.

В работе исследовали активность новых L-аспарагиназ экстремофильного происхождения: термоацидофильной археи *Acidilobus saccharovorans*, термофильной бактерии *Melioribacter roseus* и психрофильного гриба *Sclerotinia borealis*. Активные формы ферментов в рекомбинантных штаммах *Escherichia coli* получали путем экспрессии нативного гена L-аспарагиназы из *M. roseus* (MgA); для генов L-аспарагиназ из *A. saccharovorans* (AsA) и *S. borealis* (SbA) потребовалась оптимизация кодонового состава. Сравнительный анализ специфической активности рекомбинантных L-аспарагиназ при различных температурах и pH показал, что наибольшей способностью к гидролизу L-аспарагина обладала MgA. В ходе изучения влияния температуры и pH на ферментативную активность неочищенного экстракта MgA выявлено, что максимальную активность фермент проявлял при 75°C и pH 9.0. Добавление ионов металлов в концентрации 1.0 мМ оказывало различное действие на активность MgA. Катионы  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  полностью ингибировали активность фермента. При добавлении ионов  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  к неочищенному экстракту MgA специфическая активность изменялась в диапазоне 5–28%. Полученные в работе результаты указывают, что L-аспарагиназа из *M. roseus* может быть перспективным объектом для последующего детального изучения энзиматических характеристик и использования в биотехнологической промышленности.

**Ключевые слова:** L-аспарагиназа, экстремофильные микроорганизмы, гетерологическая экспрессия, противоопухолевый препарат

DOI: 10.31857/S0555109921050056

L-аспарагиназа (L-АСП, L-аспарагин-амидогидролаза, КФ 3.5.1.1) – первый для клинической онкогематологии бактериальный фермент со специфическим действием на опухолевые клетки. Он остается одним из основных препаратов комбинированной химиотерапии острого лимфобластного лейкоза на протяжении более 40 лет [1, 2]. Помимо биомедицинского применения в настоящее время проводятся исследования по использованию фермента в технологиях пищевых производств для снижения уровня акриламида, потенциально канцерогенного и нейротоксического вещества [3, 4]. Акриламид образуется в пищевых продуктах в процессе взаимодействия L-аспарагина с редуцирующими сахарами в реакции Майяра [5]. Обработка L-АСП выступает од-

ним из способов снижения уровня L-аспарагина, а следовательно, акриламида в пищевых продуктах при сохранении их органолептических характеристик.

Известные и применяемые на данный момент L-АСП не лишены недостатков. Препараты L-АСП в онкогематологии способны вызывать ряд нежелательных эффектов: аллергические реакции, гепатотоксичность, нефротоксичность, тромбозы, осложнения со стороны ЦНС и др. [6, 7]. Нежелательные проявления связывают с низкой субстратной специфичностью фермента – проявлением L-глутаминазной активности [8, 9]. Важной характеристикой является также стабильность применяемых в биомедицине L-АСП [10, 11]. Повышение стабильности фермента спо-

способствует улучшению его фармакокинетических свойств: увеличению продолжительности циркуляции в крови, снижению кратности дозирования и вероятности развития аллергических проявлений.

Применение существующих препаратов L-АСП для предобработки сырья с целью снижения уровня акриламида на пищевых производствах также ограничено, ввиду их недостаточной активности и стабильности при высоких температурах [12].

Известно, что L-АСП широко распространены в природе, характеризуются разнообразием структурно-функциональных и биохимических свойств. Этим объясняется непрерывный поиск новых источников перспективных L-АСП с повышенной специфичностью действия, активностью и стабильностью.

L-АСП выделены и охарактеризованы у множества бактерий, архей, дрожжей, мицелиальных грибов, животных, растений [2, 12]. Среди различных микроорганизмов особый интерес представляют экстремофилы, выступающие естественным источником многих высокостабильных ферментов с широкими перспективами применения в биотехнологии [13, 14]. Поскольку проблема стабильности, активности мезофильных L-АСП является одной из ключевых, усилия в данном исследовании были сфокусированы на поиске новых “экстремофильных” гомологов этих ферментов.

В качестве источников таких L-АСП были выбраны микроорганизмы 3 классов, устойчивые к различным экстремальным условиям внешней среды.

– *Sclerotinia borealis* – психрофильный гриб. Этот аскомицет способен обитать на поверхности почвы под снегом и развиваться при температурах до  $-2...-3^{\circ}\text{C}$ ; оптимальный рост наблюдается при  $-1^{\circ}\text{C}$  [15], он также способен расти в условиях сниженной влажности [16].

– *Acidilobus saccharovorans* – ацидофильная термофильная кренархея, растет в диапазоне температур от  $60$  до  $90^{\circ}\text{C}$ , оптимальный pH  $3.5-4.0$  [17].

– *Melioribacter roseus* – умеренно термофильная, факультативно анаэробная бактерия [18], имеет температурный диапазон роста  $35-60^{\circ}\text{C}$  при оптимальном  $55^{\circ}\text{C}$ .

Психрофильные L-АСП могут быть интересны, поскольку реакции, катализируемые психрофильными ферментами, термодинамически характеризуются низкой энергией активации. При этом активные сайты таких белков, как правило, больше и доступнее для субстрата. В результате их удельная активность может быть в 10 и более раз выше, чем для мезофильных гомологов при температуре  $20-30^{\circ}\text{C}$  [19]. Для исследования выбрали психрофильный гриб *S. borealis*, являющийся эукариотическим микроорганизмом. Полагают, что L-АСП эукариотического происхождения по-

тенциально менее иммуногенны для человека и имеют перспективы для разработки препаратов с улучшенным профилем безопасности [20].

Выбор термофила *M. roseus* и термоацидофила *A. saccharovorans* как источников новых L-АСП продиктован возможностью их использования как в высокотемпературных процессах в пищевой промышленности, так и в биомедицине. Установлено, что повышенная стабильность термофильных L-АСП позволяет им успешно конкурировать с L-АСП мезофильных микроорганизмов, превосходя их по активности, в том числе, в относительно мягких физиологических условиях при  $37^{\circ}\text{C}$  [21].

Цель работы – получение рекомбинантных штаммов *E. coli*, экспрессирующих L-АСП экстремофилов *S. borealis*, *A. saccharovorans*, *M. roseus*, сравнительное исследование специфической активности рекомбинантных L-АСП.

## МЕТОДИКА

**Биоинформационный анализ.** Поиск гомологичных последовательностей L-АСП проводили в среде BLAST с использованием ресурса NCBI (“National Center for Biotechnology Information”, США) [22]. Для филогенетического анализа использовали программу MEGA X (“MEGA software group”, США) [23]. Дизайн экспрессионных конструкций осуществляли в среде Vector NTI v.6.0 (“InforMax”, США) [24]. Оптимизацию кодового состава для экспрессии в клетках *E. coli* генов L-АСП из *A. saccharovorans* и *S. borealis* проводили с помощью программы Twist Codon Optimization tool (“TWIST Bioscience”, США) (<https://www.twistbioscience.com/>).

**Штаммы микроорганизмов.** В работе использовали следующие источники последовательностей экстремофильных L-АСП: *S. borealis F-4128* (геном штамма депонирован в Genbank под номером KI628577 AUSA01000000) [25], *A. saccharovorans* 345-15 (номер доступа в Genbank – NC\_014374) [17], *M. roseus* P3M-2 (номер доступа в Genbank – NC\_018178) [18]. Для создания генно-инженерных конструкций использовали штамм *E. coli* XL1-Blue (“Stratagene”, США). Гетерологическую экспрессию L-АСП экстремофилов проводили в клетках *E. coli* BL21(DE3) (“Novagene”, США).

**Конструирование экспрессионных векторов.** Экспрессионные векторы конструировали на базе коммерческой плазмиды pET-28a(+) (“Novagen”, США). Были разработаны два варианта конструкций: для экспрессии нативных и оптимизированных нуклеотидных последовательностей L-АСП. Все варианты кодирующих последовательностей для клонирования в вектор pET-28a(+) под контроль промотора гена 10 фага T7 были предварительно синтезированы компанией “TWIST Bioscience” (США).

Таблица 1. Штаммы микроорганизмов, полученные в работе

Обозначение штамма	Характеристика экспрессионного штамма		Номер доступа GenBank
	штамм <i>E. coli</i> /экспрессионная конструкция	экспрессируемый ген L-АСП, его тип	
Ec0	BL21(DE3)/pET28a(+)	–	–
Mr1	BL21(DE3)/pET28a(+)_ <i>mrA</i>	<i>mrA</i> , дикий тип из <i>M. roseus</i> P3M-2	MROS_RS06765 [18]
As1	BL21(DE3)/pET28a(+)_ <i>asA</i>	<i>asA</i> , дикий тип из <i>A. saccharovorans</i> 345-15	ASAC_RS04025 [17]
Sb1	BL21(DE3)/pET28a(+)_ <i>sbA</i>	<i>sbA</i> , сплайсированная последовательность гена дикого типа из <i>S. borealis</i> F-4128	SBOR_3103 [25]
As2	BL21(DE3)/pET28a(+)_ <i>asA<sub>mod</sub></i>	<i>asA<sub>mod</sub></i> , синтетический аналог <i>asA</i> , получен после оптимизации кодового состава для экспрессии в <i>E. coli</i>	MW699185, данная работа
Sb2	BL21(DE3)/pET28a(+)_ <i>sbA<sub>mod</sub></i>	<i>sbA<sub>mod</sub></i> , синтетический аналог <i>sbA</i> , получен после оптимизации кодового состава для экспрессии в <i>E. coli</i>	MW699184, данная работа

Первую серию векторов получили после клонирования нативных кодирующих последовательностей L-АСП экстремофилов, содержащих дополнительные сайты рестрикции на 5'- и 3'-концах. Для этого последовательности, содержащие ген MROS\_RS06765 (из *M. roseus* P3M), ген ASAC\_RS04025 (из *A. saccharovorans* 345-15) и сплайсированный вариант гена для SBOR\_3103 (из *S. borealis* F-4128) гидролизовали по сайтам *NheI*/*HindIII* и встраивали в гидролизованный по сайтам *NheI*/*HindIII* вектор pET-28a(+). В результате получали конструкции pET28a(+)\_*mrA*, pET28a(+)\_*asA* и pET28a(+)\_*sbA*. Для получения рекомбинантных L-АСП из археи *A. saccharovorans* 345-15 и гриба *S. borealis* F-4128 дополнительно сконструировали векторы, несущие последовательности с оптимизированным для экспрессии в *E. coli* кодовым составом. Последовательности гидролизовали по сайтам *NheI*/*HindIII* и встраивали в гидролизованный по сайтам *NheI*/*HindIII* вектор pET-28a(+). В результате получили конструкции pET28a(+)\_*asA<sub>mod</sub>* и pET28a(+)\_*sbA<sub>mod</sub>*.

**Получение рекомбинантных штаммов.** Для гетерологической экспрессии L-АСП экстремофилов созданные конструкции трансформировали в клетки *E. coli* BL21(DE3). В результате получили рекомбинантные штаммы Mr1, As1, Sb1, As2, Sb2 (табл. 1). Штамм Ec0 (табл. 1), полученный при трансформации *E. coli* BL21(DE3) исходной плазмидой pET28a(+), использовали в качестве контроля во всех экспериментах.

**Культивирование штаммов.** Штаммы *E. coli* BL21(DE3), экспрессирующие L-АСП экстремофилов, и штамм Ec0 культивировали согласно

условиям, описанным ранее [26], в LB среде с добавлением 0.05 мг/мл канамицина при 37°C. Штаммы Sb1, As1, As2 и Sb2 дополнительно выращивали при 24°C. Индуктор (лактозу или ИПТГ) добавляли в среду при OD<sub>600</sub> = 0.5, 1.0 либо 1.9 до конечной концентрации 0.02, 0.1 либо 0.2%. Клеточную биомассу собирали через 17–20 ч после индукции.

**Определение ферментативной активности L-аспарагиназы.** После культивирования клетки собирали центрифугированием (4000 г, 15 мин), ресуспендировали в буферах с различными значениями pH: А (0.1 мМ Na-ацетатный, pH 5.2), Б (0.1 мМ Na-фосфатный, pH 7.3), В (0.1 мМ боратный, pH 9.6). Далее клетки разрушали ультразвуком в условиях, описанных ранее [26]. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 12000 г, 15 мин при 4°C. Активность L-АСП определяли в супернатанте (неочищенном экстракте) по количеству образовавшегося аммиака методом прямой несселеризации [29, 30]. Реакции проводили в буферах А, Б и В при температурах 24, 37 и 94°C. За 1 единицу активности L-аспарагиназы (1 МЕ – международная единица) принимали количество фермента, катализирующее высвобождение 1 мкмоль аммиака за 1 мин в условиях эксперимента, активность выражали в МЕ/мл.

**Влияние на ферментативную активность температуры и pH.** Специфическую активность неочищенного экстракта L-АСП определяли в инкубационной смеси в 0.05 М трис-HCl буфере, pH 7.8, в интервале температур 37–80°C. Влияние pH на активность фермента изучали при температуре, соответствующей максимальной активности не-

очищенного фермента, с L-аспарагином в качестве субстрата в следующих буферных системах: 0.1 М Na-фосфатной, pH 7.1–8.0; 0.05 М трис-HCl, pH 7.8–9.0; 0.25 М боратный, pH 9.0–9.5. Относительную активность выражали в % от максимального значения, установленного в эксперименте.

**Определение влияния ионов металлов.** Активность L-АСП в неочищенном экстракте определяли при добавлении ионов металлов ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ), а также ЭДТА. Все вещества ( $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$  и ЭДТА) добавляли в концентрации 1.0 мМ. Ферментативную активность определяли при значениях температуры и pH, соответствующих максимальной активности неочищенного фермента (75°C, pH 9.0), при добавлении L-аспарагина и соответствующих ионов металлов в трех повторностях. Полученные значения выражали в % от активности фермента без добавления катионов металлов, которую принимали за 100%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Идентификация и анализ последовательностей экстремофильных L-АСП.** В качестве источников новых перспективных L-АСП были выбраны экстремофилы с ранее аннотированными геномными последовательностями: психрофильный мицелиальный гриб *S. borealis* F-4128 [25], ацидофильная термофильная кренархея *A. saccharovorans* 345-15 [17], а также термофильная бактерия *M. roseus* P3M-2 [18]. Данные микроорганизмы, являясь представителями трех доменов, адаптированы к росту при различных экстремальных факторах среды. Филогенетический анализ на основе белковых последовательностей показал, что L-АСП психрофильного гриба *S. borealis* F-4128 (SbA) кластеризуется с L-АСП грибного происхождения, относящимся к *Botrytis* sp., *Molinilia* sp. и *Aspergillus* sp. Уровень идентичности данных L-АСП составляет 91–78% (рис. 1, табл. 2). Ближайшими гомологами L-АСП *A. saccharovorans* 345-15 (AsA) являются L-АСП *Acidilobus* sp. Уровень их гомологии варьирует в диапазоне 78–64% (рис. 1, табл. 2). Для L-АСП термофильной бактерии *M. roseus* (MrA) показано промежуточное положение между L-АСП *Acidilobus* sp. и представителями группы *Bacteroidetes/Chlorobi*, к которой относится данный микроорганизм (рис. 1, табл. 2).

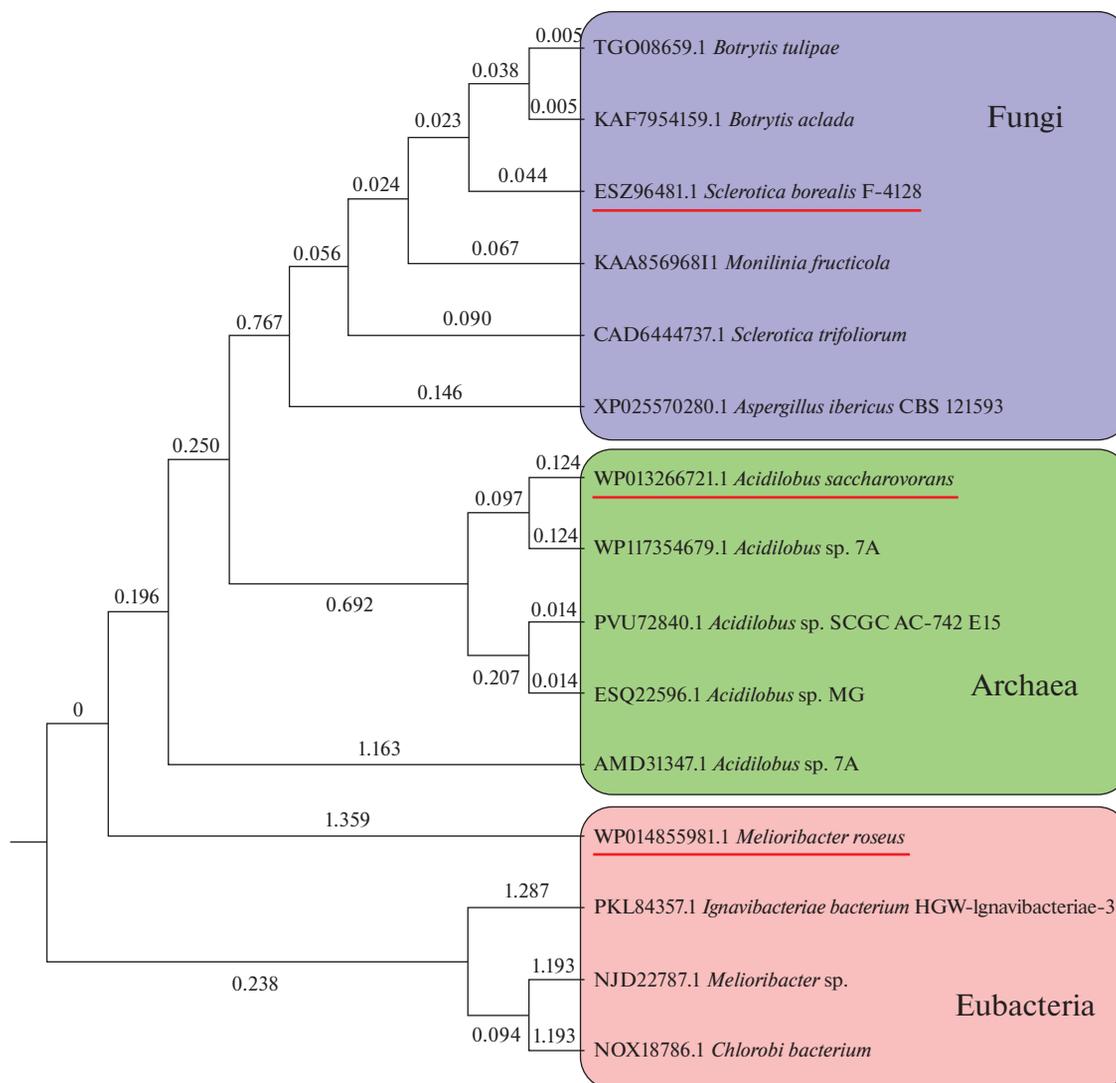
Сравнение SbA, AsA и MrA с подробно изученными L-АСП экстремофильного и мезофильного происхождения показало низкий уровень их гомологии, который не превышал 27% (табл. 2). Согласно данным анализа, наиболее близкими идентифицируемыми гомологами для изучаемых в работе SbA, AsA и MrA могут быть ранее неохарактеризованные L-АСП, основны-

ми источниками которых являются некультивируемые штаммы микроорганизмов (табл. 2). L-АСП *A. saccharovorans* 345-15 по классификации CDD относится к неохарактеризованному подсемейству L-аспарагиназа 2-подобных ферментов архебактерий.

**Клонирование и экспрессия генов экстремофильных L-АСП.** Гетерологическую экспрессию изучаемых экстремофильных L-АСП проводили в клетках мезофильной бактерии *E. coli* BL21(DE3) под контролем промотора гена 10 фага T7 в составе вектора pET-28a(+). На первом этапе создали конструкции для экспрессии нативных генов L-АСП. При культивировании рекомбинантных штаммов в стандартных условиях (индукция 0.2%-ой лактозой при  $\text{OD}_{600} = 1.0$ ) активность L-АСП обнаружили только для штамма Mr1. У штаммов As1 и Sb1 L-АСП активность полностью отсутствовала. Поскольку оптимизация условий экспрессии для этих штаммов (по температуре культивирования, оптической плотности клеток при добавлении индуктора, концентрации и типу индуктора) не позволила получить активные формы ферментов, провели оптимизацию кодонового состава кодирующих их последовательностей для экспрессии в клетках *E. coli*.

В ходе частичной замены редких для данного микроорганизма минорных кодонов на синонимичные мажорные кодоны получили синтетические варианты генов, кодирующих AsA и SbA аналогичного аминокислотного состава. Оптимизированные последовательности для L-АСП из психрофильного гриба *S. borealis* F-4128 и термоацидофильной кренархеи *A. saccharovorans* 345-15, депонированные в Genbank под номерами доступа MW699184 и MW699185 соответственно, синтезировали и использовали для создания генно-инженерных конструкций на базе вектора pET-28a(+) для экспрессии в клетках *E. coli* BL21(DE3) (табл. 1). Полученные таким образом рекомбинантные штаммы As2 и Sb2, экспрессирующие модифицированные *asA<sub>mod</sub>* и *sbA<sub>mod</sub>* соответственно, проявляли L-аспарагиназную активность. В оптимизированных условиях культивирования штаммов As2 и Sb2 проводили при температуре 24°C, в качестве индуктора добавляли лактозу при  $\text{OD}_{600} = 0.5$  до конечной концентрации 0.2%.

Оптимизация нуклеотидной последовательности позволила провести гетерологическую экспрессию неизученной ранее психрофильной L-АСП грибов и полиэкстремофильной L-АСП архей, относящейся к неохарактеризованному подсемейству L-аспарагиназа 2-подобных ферментов архебактерий. Ранее предпринимались попытки гомологичной экспрессии L-АСП психрофилов и ацидофилов, которые сопровождалась необходимостью многофакторной оптимизации условий культивирования продуцентов и высокой вари-



**Рис. 1.** Филогенетическая дендрограмма последовательностей L-АСП микроорганизмов. Дендрограмма построена по методу попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA), подчеркнуты исследуемые в работе последовательности.

бельностью ферментативной активности экспрессируемых таким образом L-АСП [19, 20, 35, 36].

Следует отметить, что источниками белков экстремофильного происхождения часто являются микроорганизмы, некультивируемые либо требующие особых условий культивирования, экспрессии целевого белка, что существенно осложняло возможность как их изучения, так и возможного биотехнологического получения. В частности, для роста изучаемого психрофильного гриба *S. borealis* необходимы пониженные температуры [15]. Для культивирования полиэкстремофильной кренархеи *A. saccharovorans* и термофильной бактерии *M. roseus* требуется повышенная температура и создание анаэробных условий [18, 27].

Для характеристики L-АСП таких бактерий, архей или грибов могут быть использованы рекомбинантные штаммы на базе *E. coli*. В ходе ра-

боты по экспрессии природных кодирующих последовательностей активность проявлял фермент из экстремофильной бактерии *M. roseus* РЗМ-2. Для L-АСП архейного и грибного происхождения и экспрессии в клетках *E. coli* потребовалась предварительная оптимизация кодонового состава. Рекомбинантные штаммы As2 и Sb2, экспрессирующие синтетические варианты нуклеотидных последовательностей L-АСП *asa<sub>mod</sub>* и *sbA<sub>mod</sub>*, а также Mg1 с экспрессией нативной последовательности *mra* использовали для последующей характеристики ферментативной активности этих белков.

**Ферментативная активность неочищенных экстрактов L-АСП экстремофилов.** Активность гетерологично экспрессируемых L-АСП экстремофилов оценивали методом прямой несслеризации при различных экспериментальных условиях — температуре и pH (рис. 2). Наиболее высокую L-АСП

Таблица 2. Сравнение аминокислотных последовательностей L-АСП

Микроорганизм-источник L-АСП	Номер доступа последовательности в GenBank	Идентичность, %	Комментарии
Гомологи L-АСП <i>S. borealis</i> F-4128			
<b><i>S. borealis</i> F-4128</b>	<b>ESZ96481.1</b>	<b>100.00</b>	<b>SbA, изучаемая L-АСП</b>
<i>Botrytis tulipae</i>	TGO08659.1	91.78	Гипотетический белок, предсказанный по гомологии
<i>Botrytis aclada</i>	KAF7954159.1	91.51	
<i>Botryotinia squamosa</i>	KAF7869258.1	90.98	
<i>Monilinia fructicola</i>	KAA8569682.1	85.75	
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980 UF-70	APA11519.1	83.64	
<i>Sclerotinia trifoliorum</i>	CAD6444737.1	83.64	
<i>Aspergillus ibericus</i> CBS 121593	XP_025570260.1	77.99	
<i>Pyrococcus yayanosii</i> CH1	AEH25396.1	27.21	Охарактеризованная периплазматическая L-АСП II типа экстремофильной археи [29]
<i>Thermococcus kodakarensis</i>	WP_011250607.1	25.17	Охарактеризованная периплазматическая L-АСП II типа экстремофильной археи [30]
<i>E. coli</i>	WP_167585435.1	24.25	Охарактеризованная периплазматическая L-АСП II типа мезофильной бактерии [31, 32]
Гомологи L-АСП <i>A. saccharovorans</i> 345-15			
<b><i>A. saccharovorans</i> 345-15</b>	<b>WP_013266721.1</b>	<b>100.00</b>	<b>AsA, изучаемая L-АСП</b>
<i>Acidilobus</i> sp. 7A	WP_117354679.1	78.25	Неохарактеризованное субсемейство L-АСП 2 типа архейного происхождения
<i>Acidilobus</i> sp. SCGC AC-742_E15	PVU72840.1	65.31	
<i>Acidilobus</i> sp. MG	ESQ22596.1	63.58	Гипотетический белок из некультивируемого вида, предсказанный по гомологии
Гомологи L-АСП <i>M. roseus</i> P3M-2			
<b><i>M. roseus</i> P3M-2</b>	<b>WP_014855981.1</b>	<b>100.00</b>	<b>MгA, изучаемая L-АСП</b>
<i>Ignavibacteria bacterium</i>	KAF0152192.1	70.16	Гипотетический белок, предсказанный по гомологии
<i>Melioribacter</i> sp.	NJD22787.1	65.56	
<i>Chlorobibacterium</i>	NOX18786.1	62.34	

активность среди изученных гомологов показал фермент умеренно термофильной бактерии *M. roseus* P3M-2. Максимальное значение активности фермента 9.6 МЕ/мл было при 37°C и pH 9.6. Повышение температуры до 94°C, а также снижение pH приводили к резкому падению активности L-АСП (рис. 2а).

Активность SbA была значительно ниже и составляла 1.7 – 6.6% (0.2–0.6 МЕ/мл) от максимальной активности, полученной для MгA в этой серии экспериментов (рис. 2б). При этом наилучшие показатели активности L-АСП из *S. borealis* F-4128 наблюдали при 24°C и щелоч-

ных pH (pH 9.6). Эти результаты согласовывались с ранее полученными результатами оценки активности L-АСП психрофильных мицелиальных грибов, изолированных на острове Кинг-Джордж (Антарктика) [33]. При культивировании 42 представителей мицелиальных грибов, относящихся к родам *Geomyces*, *Pseudogymnoascus*, *Cosmospora*, *Hypocrea*, *Cadophora*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Pseudeurotium*, *Oidiodendron* и *Acremonium*, их активность варьировала в диапазоне 0.2–1.45 МЕ/мл [33].

Активность L-АСП AsA составила 4.5–26.7% (0.4–2.6 МЕ/мл) от максимальной для MгA

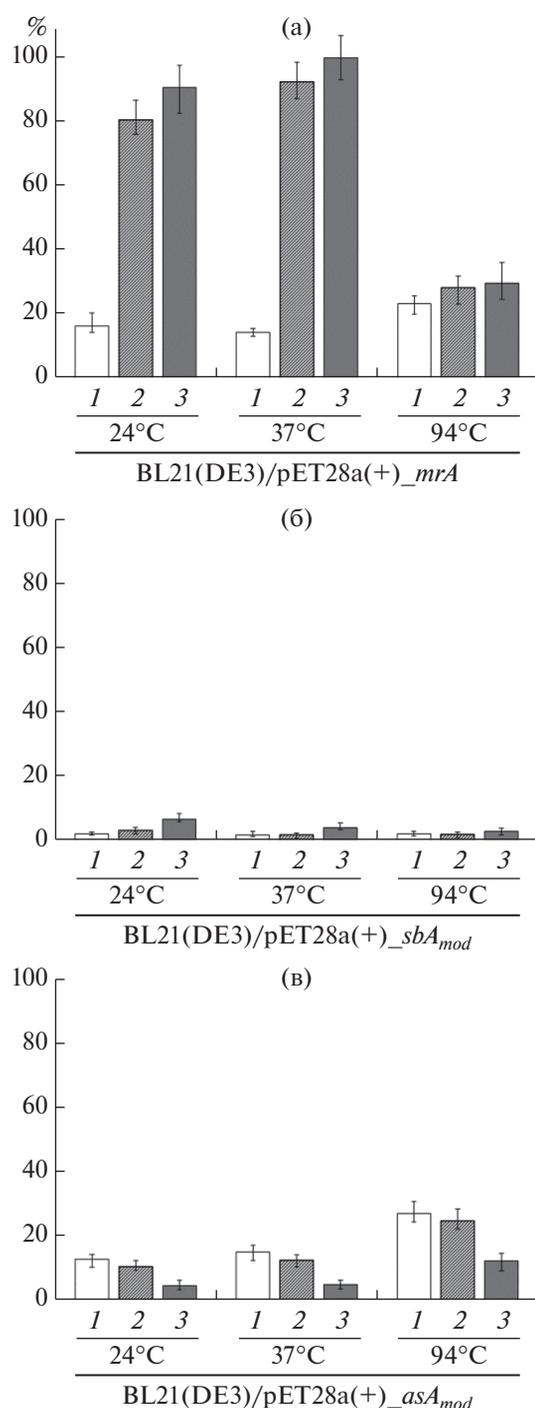
(рис. 2в). AsA демонстрировала максимальную активность при 94°C и pH 5.2, что соответствовало условиям обитания этой полиэкстремофильной кренархеи при повышенных температурах и кислых pH. Среди ацидофильных микроорганизмов, у которых была обнаружена активность L-АСП, описан аскомицет *Aspergillus terreus*, который используется в биотехнологической промышленности для получения вторичных метаболитов [35–37]. При культивировании *A. terreus* в оптимизированных условиях (35°C, pH 6.0) активность L-АСП составила 4.81 МЕ/мг [34].

Проведенные эксперименты в различных условиях показали, что L-АСП активность MгА превосходила таковую SbA и AsA в 5–50 раз. Таким образом, MгА рассматривалась как наиболее перспективная и была выбрана для последующего изучения.

**Влияние температуры на ферментативную активность MгА.** Изучение влияния температуры на активность неочищенного экстракта L-АСП MгА проводили в диапазоне значений 37–80°C. Максимальная активность рекомбинантного фермента MгА (190–205 МЕ/мл) проявлялась при 75°C (рис. 3а). При этом более 75% от максимального уровня L-АСП активности MгА наблюдали в интервале температур 60–75°C (рис. 3а). При температуре ниже 50°C, а также свыше 78°C происходило резкое снижение активности фермента (рис. 3а).

В ходе предварительного скрининга в физиологических условиях при 37°C была установлена активность MгА 9.6 МЕ/мл (pH 9.6). Дополнительные исследования на неочищенном экстракте показали, что активность препарата при 37°C составила 4.8% от максимальной при 75°C и pH 7.8. Ранее для термофильной L-АСП *Thermococcus kodakaraensis* KOD1, проявляющей максимальную L-АСП активность при 85°C, pH 9.5, в физиологических условиях (при 37°C) также фиксировали падение активности фермента до уровня 4% от максимальной [21].

**Влияние pH на ферментативную активность MгА.** Зависимость активности MгА от pH среды изучали в диапазоне значений 7.1–9.5. Максимальная активность фермента проявлялась при pH 9.0. При этом более 75% активности сохранялось в интервале значений pH 7.5–9.5 (рис. 3б). Повышение ферментативной активности при сдвиге в область слабощелочных pH, установленное для MгА, показано также для других L-АСП. Высокая каталитическая активность в диапазоне pH 7.0–9.0 при pH-оптimumе большинства из них 8.0–8.5 наблюдалась у *Thermococcus zilligii*, *Thermococcus gammatolerans*, *Pyrococcus uyanosii*, *Pyrococcus furiosus* [38]. Среди L-АСП термофильных бактерий pH-оптimum 8.0–9.0 установлен для *Streptomyces thermoluteus* subsp. fuscus NBRC 14270 [39].



**Рис. 2.** Относительная активность рекомбинантных L-АСП экстремофилов (%) после экспрессии в штаммах Mг1 (а), Sb2 (б) и As2 (в) при 24, 37 и 94°C и pH 5.2 (1), 7.3 (2) и 9.6 (3).

Оптимальные значения pH среды для многих L-АСП мезофильных штаммов аналогичны: оптимум pH 8.0–9.0 характерен для L-АСП *E. coli*, *Erwinia chrysanthemii*, *Pseudomonas stutzeri*, *Erwinia carotovora* [38, 40].

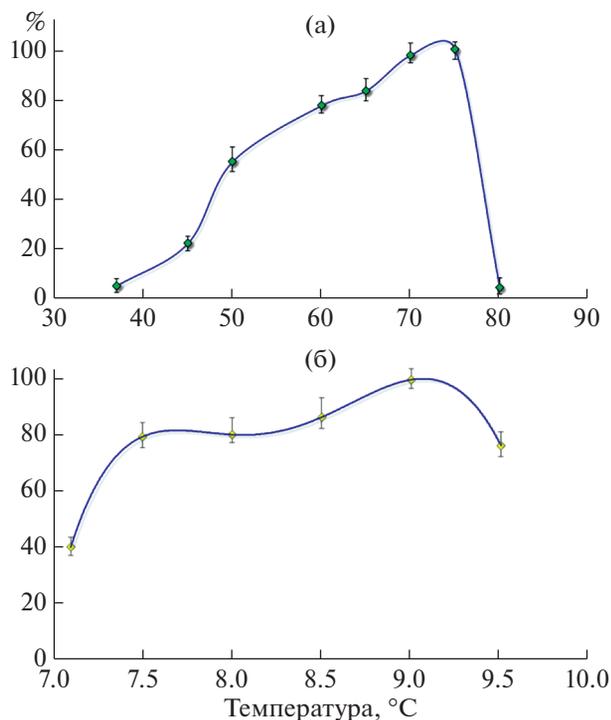


Рис. 3. Зависимость активности L-АСП *M. roseus* РЗМ-2 (%) от температуры (а) и рН (б).

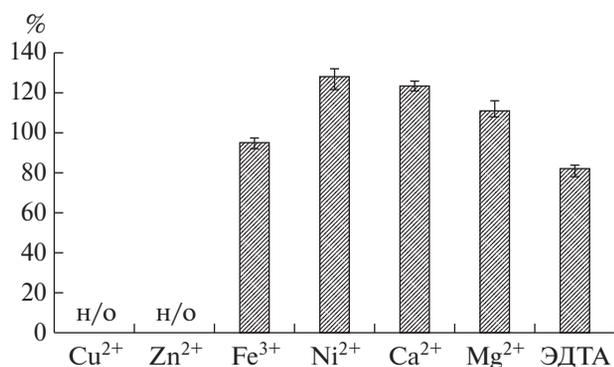


Рис. 4. Влияние ионов металлов и ЭДТА (%) на активность L-АСП *M. roseus* РЗМ-2. Все соединения добавляли в концентрации 1 мМ, за 100% принимали уровень активности, соответствующий активности L-АСП без добавок, н/о – неопределяемые значения.

Среди экстремофилов максимальная активность при более щелочной реакции среды зафиксирована только для L-АСП *Thermus thermophilus* [41] и *Archaeoglobus fulgidus* [42] – рН 9.2, а также *Thermus aquaticus* Т351 – рН 9.5 [43].

**Влияние ионов металлов на ферментативную активность MgA.** Ионы металлов могут оказывать существенное влияние на активность L-АСП. Изучение влияния ионов металлов на функциональные свойства L-АСП экстремофильных микроорганиз-

мов представляет особый интерес, поскольку они могут выступать не только в качестве кофакторов, повышая каталитическую активность, но также способны стабилизировать структуру белка посредством формирования ионных связей.

Показано, что ионы  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  в концентрации 1.0 мМ способны полностью ингибировать активность в неочищенном экстракте MgA (рис. 4). Снижение активности MgA было установлено также в присутствии 1.0 мМ ЭДТА – 18%,  $\text{Fe}^{3+}$  – 5% (рис. 4). В то же время присутствие ионов  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  в концентрации 1.0 мМ приводило к увеличению активности MgA на 28, 23 и 11% соответственно (рис. 4).

Полученные в работе результаты согласовывались с ранее опубликованными результатами исследований по влиянию ионов металлов на ферментативную активность L-АСП. Так, среди мезофильных гомологов фермента в присутствии  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  отмечали рост активности коммерческой L-АСП из *E. coli*, добавление  $\text{Mg}^{2+}$  увеличивало активность фермента на 330.6% [44]. В то же время для L-АСП *Erwinia carotovora* наблюдали снижение активности в присутствии дивалентных ионов 1.0 мМ  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$ , а также 0.5 мМ  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ , причем добавление 1.0 мМ  $\text{Cu}^{2+}$ , как и для MgA, приводило к полному ингибированию фермента [45].

Для экстремофильных L-АСП также показано изменение активности в присутствии ионов металлов. Так, повышение активности L-АСП *Thermococcus zilligii* на 15–20% вызывало добавление 1 мМ  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ , ионы  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$  не оказывали существенного влияния на активность фермента. Полученные результаты сопоставимы с результатами изучения L-АСП *Thermococcus gammatolerans* EJ3 за исключением ионов  $\text{Zn}^{2+}$ , которые приводили к снижению активности фермента [46, 47].

Ранее установлено, что ионы  $\text{Mg}^{2+}$  в концентрациях 1 либо 10 мМ способствовали повышению активности L-АСП *T. kodakaraensis* на 138 и 127% соответственно,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$  (10 мМ) – полностью ингибировали фермент;  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и ЭДТА снижали активность до 80, 15 и 90% от исходной соответственно [48].

Таким образом, выявлено, что ионы металлов могут оказывать влияние на активность MgA, аналогично ранее изученным L-АСП мезофильных и экстремофильных штаммов. Активирующий эффект обнаружен при добавлении 1.0 мМ  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . В работах [49, 50] было показано, что  $\text{Ca}^{2+}$ , а также  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ , связываясь с молекулой белка, играют важную роль в стабилизации структуры, предотвращая денатурацию при высоких температурах.

Экстремофилы, устойчивые к различным факторам внешней среды, являются естественным источником ферментов, которые могут быть использованы в биотехнологии. L-АСП экстремофильных штаммов характеризуются высокой энзиматической активностью и стабильностью в широком диапазоне условий реакции, что определяет перспективы их применения в биомедицине, пищевых технологиях, создании биосенсоров [47, 48, 51].

В настоящей работе представлены результаты гетерологической экспрессии ранее неохарактеризованных L-АСП экстремофилов: психрофильного гриба *S. borealis*, термоацидофильной кренархеи *A. saccharovorans* и термофильной бактерии *M. roseus*. Для экспрессии L-АСП грибного и архейного происхождения в реципиентном штамме *E. coli* потребовалась оптимизация кодонового состава их нуклеотидных последовательностей.

Показано, что полученные рекомбинантные L-АСП различны по активности, характеру влияния на нее температуры и pH. В предварительном скрининге на неочищенных экстрактах максимальные значения специфической активности для MgA составили 9.6 МЕ/мл при 37°C и pH 9.6; AsA – 2.6 МЕ/мл при 94°C и pH 5.2, для SbA – 0.6 МЕ/мл при 24°C и pH 9.6. Несмотря на низкую активность AsA из ацидофильной археи и SbA и психрофильного гриба, близкие значения ранее были получены для L-АСП ацидофила *A. terreus*, (4.81 МЕ/мл) [34] и других психрофильных грибов (0.2–1.45 МЕ/мл) [33].

Для L-АСП неочищенного экстракта MgA, проявляющей наибольшую активность, было изучено влияние температуры, pH, а также влияние ионов металлов. Установлено, что максимальная активность MgA проявлялась при 75°C и слабощелочном pH – 9.0. Ионы металлов по-разному влияли на активность фермента: 1 mM Cu<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup> приводили к полному ингибированию, ионы Fe<sup>3+</sup> снижали активность на 5%, а Ni<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> повышали активность на 28, 23 и 11% соответственно.

Полученные в работе результаты создают предпосылки для дальнейшего изучения свойств и кинетических характеристик очищенных препаратов L-АСП этих экстремофилов.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 19-04-01173 и в рамках “Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.)”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Solomon B., Parihar N., Ayodele L., Hughes M. // J. Blood Disord. Transfus. 2017. V. 8. P. 24.
2. Brumano L.P., da Silva F.V.S., Costa-Silva T.A. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2018. V. 6. P. 1–22.
3. Baskar G., Subanjalin J. S., Aiswarya R. // Int. J. Mod. Sci. Technol. 2016. V. 6. № 1. P. 224–229.
4. Aiswarya R., Baskar G. // Int. J. Food Sci. Technol. 2018. V. 53. P. 491–498.
5. Baskar G., Aiswarya R. // J. Science of Food and Agriculture. 2018. V. 98. P. 4385–4394.
6. El-Naggar N.E.A., El-Ewasy S.M., El-Shweihy N.M. // Int. J. Pharmacol. 2014. V. 10. P. 182–199.
7. Duval M., Suci S., Ferster A. // Blood. 2002. V. 99. P. 2734–2739.
8. Matsumoto Y., Nomura K., Kanda-Akano Y. // Leuk. Lymphoma. 2003. V. 44. P. 879–882.
9. Соколов Н.Н., Эльдаров М.А., Покровская М.В., Александрова С.С., Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Мелик-Нубаров Н.С., Кудряшова Е.В., Гришин Д.В., Арчаков А.И. // Биомедицинская химия. 2015. V. 61. № 3. P. 312–324.
10. Nunes J.C.F., Cristóvão R.O., Freire M.G. // Molecules (Basel, Switzerland). 2020. V. 25. № 24. P. 5827.
11. Varshosaz J., Anvari N. // IET Nanobiotechnology. 2018. V. 12. № 4. P. 466–472.
12. Krishnapura P.R., Belur P.D., Subramanya S. // Crit. Rev. Microbiol. 2016. V. 42. № 5. P. 470–737.
13. Sarmiento F., Peralta R., Blamey J.M. // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2015. V. 3. P. 148.
14. Van den Burg B. // Curr/Opin/Microbiol/. 2003. V. 6. № 3. P. 213–218.
15. Hoshino T., Xiao N., Tkachenko O.B. // Mycoscience. 2009. V. 50. № 1. P. 26–38.
16. Hoshino T., Terami F., Tkachenko O.B., Tojo M., Matsumoto N. // Mycoscience. 2010. V. 51. № 2. P. 98–103.
17. Mardanov A.V., Svetlitchnyi V.A., Beletsky A.V. // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. № 16. P. 5652–5657.
18. Podosokorskaya O.A., Kadnikov V.V., Gavrillov S.N. // Environ. Microbiol. 2013. V. 15. № 6. P. 1759–1771.
19. Tiwari A.K., Rao J.V., Doriya K., Kumar D.S., Qureshi A., Ashok A. // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 1423.
20. Moguel I.S., Yamakawa C.K., Pessoa A., Mussatto S.I. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. V. 8. P. 576511.
21. Chohan S.M., Rashid N. // J. Biosci. Bioeng. 2013. V. 116. P. 438–443.
22. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A. // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. № 17. P. 3389–3402.
23. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549.
24. Lu G., Moriyama E.N. // Softw. Rev. 2004. V. 5. № 4. P. 378–388.
25. Mardanov A.V., Beletsky A.V., Kadnikov V.V., Ignatov A.N., Ravin N.V. // Genome Announc. 2014. V. 2. № 1. P. e01175–13.
26. Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Pokrovsky V.S., Veselovsky A.V., Grishin D.V., Abakumova O.Y., Podobed O.V., Mishin A.A., Zhdanov D.D., Sokolov N.N. // Mol. Biotechnol. 2015. V. 57. № 3. P. 192–208.
27. Wriston J.C., Yellin T.O. // Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology. 2006. V. 39. P. 185–248.
28. Wade H.E., Robinson H.K., Phillips B.W. // J. Gen. Microbiol. 1971. V. 69. № 3. P. 299–312.

29. Li A.N., Ding A.Y., Chen J., Liu S.A., Zhang M., Li D.C. // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 7915.
30. Guo J., Coker A.R., Wood S.P. // Acta Cryst. 2017. V. 73. P. 889–895.
31. Safary A., Moniri R., Hamzeh-Mivehroud M., Dastmalchi. S. // BioImpacts. 2019. V. 9. P. 15–23.
32. Kelo E., Noronkoski T., Stoineva I.B., Petkov D.D., Mononen I. // FEBS Lett. 2002. V. 528. P. 130–132.
33. Duarte A.W.F., Barato M.B., Nobre F.S. // Polar Biol. 2018. V. 41. № 12. P. 2511–2521.
34. Farag A.M., Hassan S.W., Beltagy E.A., El-Shenawy M.A. // Egypt. J. Aquat. Res. 2015. V. 41. № 4. P. 295–302.
35. Zhgun A.A., Nuraeva G.K., Dumina M.V., Voinova T.M., Dzhavakhiya V.V., Eldarov M.A. // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55. № 3. P. 243–254.
36. Gunny A.A.N, Arbain D., Jamal P., Gumba R.E. // Saudi J. Biol. Sci. 2015. V. 22. № 4. P. 476–483.
37. Zhgun A.A., Dumina M.V., Voinova T.M., Dzhavakhiya V.V., Eldarov M.A. // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. № 2. P. 188–197.
38. Dumina M.V., Eldarov M.A., Zdanov D.D., Sokolov N.N. // Biomeditsinskaya Khimiya. 2020. V. 66. № 2. P. 105–123.
39. Hatanaka T., Usuki H., Arima J. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2011. V. 163. № 7. P. 836–844.
40. Borisova A.A., Eldarov M.A., Zhgun A.A., Alexandrova S.S., Omelyanuk N.M., Sokov B.N., Berezov T.T., Sokolov N.N. // Biomeditsinskaya Khimiya. 2003. V. 49. № 5. P. 505–507.
41. Pritsa A.A., Kyriakidis D.A. // Mol. Cell. Biochem. 2001. V. 216. № 1–2. P. 93–101.
42. Li J., Wang J., Bachas L.G. // Anal. Chem. 2002. V. 74. № 14. P. 3336–3341.
43. Curran M.P., Daniel R.M., Guy G.R., Morgan H.W. // Arch. Biochem. Biophys. 1985. V. 241. № 2. P. 571–576.
44. Han S., Jung J., Park W. // J. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 24. № 8. P. 1091–1104.
45. Warangkar S.C., Khobragade C.N. // Enzyme Res. 2010. V. 2010. P. 1–10.
46. Zuo S., Zhang T., Jiang B., Mu W. // Extremophiles. 2015. V. 19. № 4. P. 841–851.
47. Zuo S., Xue D., Zhang T., Jiang B., Mu W. // J. Mol. Catal. B Enzym. 2014. V. 109. № 14. P. 122–129.
48. Hong S.J., Lee Y.H., Khan A.R. // J. Basic Microbiol. 2014. V. 163. № 7. P. 826–834.
49. Li A.N., Ding A.Y., Chen J., Liu S.A., Zhang M., Li D.C. // J. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 17. № 4. P. 324–631.
50. De Azeredo L.A.I., Freire D.M.G., Soares R.M.A., Leite S.G.F., Coelho R.R.R. // Enzyme Microb. Technol. 2004. V. 34. № 3–4. P. 354–358.
51. Chohan S.M., Rashid N., Sajed M. // Folia Microbiologica. 2019. V. 64. № 2. P. 313–320.

## Comparison of Enzymatic Activity of Novel Recombinant L-Asparaginases of Extremophiles

M. V. Dumina<sup>a, \*</sup>, A. A. Zhgun<sup>a</sup>, M. V. Pokrovskaya<sup>b</sup>, S. S. Aleksandrova<sup>b</sup>,  
D. D. Zhdanov<sup>b</sup>, N. N. Sokolov<sup>b</sup>, and M. A. El'darov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Research Center of Biotechnology RAS, Moscow, 117312 Russia

<sup>b</sup>Institute of Biomedical Chemistry, Moscow 119121 Russia

\*e-mail: DuminaMaria@gmail.com

In this study we have performed heterologous expression of novel uncharacterized extremophilic L-asparaginases from psychrophilic fungi *Sclerotinia borealis*, thermoacidophilic crenarchaea *Acidilobus saccharovorans* and thermophilic bacteria *Melioribacter roseus*. Active enzymes were produced by expression of native L-asparaginase gene from *M. roseus* (Mr) and synthetic genes coding fungal *S. borealis* (SbA) and archeal *A. saccharovorans* (AsA) L-asparaginases after codon optimization in *Escherichia coli* cells. In the study maximum specific activity at different temperatures and pH was observed for MrA. The activity of crude extract MrA was maximum at 75°C and pH 9.0. We have explored that various metal ions 1 mM have different effect on enzyme activity. Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions completely abolished enzyme activity. The range of crude extract MrA specific activity changes in the presence of Fe<sup>3+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and Mg<sup>2+</sup> was estimated to be 5–28%. According to our findings L-asparaginase *M. roseus* may be perspective for further investigation of enzymatic properties and biotechnology application.

**Keywords:** L-asparaginase, extremophilic microorganism, heterologous expression, anticancer drug