

©Коллектив авторов

ПОДАВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТЕЛОМЕРАЗЫ ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК МУТАНТНЫМИ ФОРМАМИ L-АСПАРАГИНАЗЫ *RHODOSPIRILLUM RUBRUM*

М.В. Покровская^{1*}, Д.Д. Жданов¹, М.А. Эльдаров², С.С. Александрова¹, А.В. Веселовский¹,
В.С. Покровский³, Д.В. Гришин¹, Ю.А. Гладилина¹, Н.Н. Соколов¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8; тел.: 8(499)246-33-80; эл. почта: ivan1190@yandex.ru

²ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2

³ФГБУ "РОНЦ им.Н.Н.Блохина" Минздрава России

Методом сайт-направленного мутагенеза получены в очищенном состоянии активные и стабильные мутантные формы короткоцепочечной цитоплазматической L-аспарагиназы I типа из *Rhodospirillum rubrum* (RrA): RrA_{+N17, D60K, F61L}, RrA_{+N17, A64V, E67K}, RrA_{+N17, E149R, V150P}, RrA_{E149R, V150P} и RrA_{E149R, V150P, F151T}. Установлено, что варианты RrA_{E149R, V150P, F151T} и RrA_{+N17, E149R, V150P} способны снижать экспрессию hTERT субъединицы теломеразы и, следовательно, активность теломеразы в клетках Jurkat, но не в клеточных лизатах. В то же время, L-аспарагиназы *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*, *Wolinella succinogenes*, мутантные формы RrA_{+N17, D60K, F61L} и RrA_{+N17, A64V, E67K} не подавляли активность теломеразы. Сделано предположение о существовании в структуре RrA областей (аминокислотные остатки 146-164, 1-17, 60-67), отвечающих за подавление теломеразной активности. Полученные результаты показывают, что противоопухолевая активность некоторых вариантов RrA связана как с уменьшением концентрации свободного L-аспарагина, так и с угнетением экспрессии hTERT субъединицы теломеразы, что открывает новые перспективы для противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: L-аспарагиназа *Rhodospirillum rubrum*, противоопухолевый эффект L-аспарагиназ, сайт-направленный мутагенез, теломераза, hTERT субъединица теломеразы

DOI 10.18097/PBMC20176301062

ВВЕДЕНИЕ

L-Аспарагиназы (КФ 3.5.1.1) катализируют реакцию гидролиза L-аспарагина до аспарагиновой кислоты и аммиака. Начиная с 70-х годов прошлого столетия бактериальные L-аспарагиназы *Escherichia coli* (EcA) и *Erwinia carotovora* (EwA), успешно используются в комбинированной химиотерапии острых лимфобластных лейкозов и ряда лимфом [1]. Избирательное подавление пролиферации под действием L-аспарагиназ связано с истощением внеклеточного L-аспарагина необходимого быстро растущим опухолевым клеткам в значительно большей степени, чем нормальным тканям. Противоопухолевый эффект L-аспарагиназ обусловлен также крайне низкой активностью аспарагинсинтетазы (или полным её отсутствием) в чувствительных к ферменту клетках лейкоза человека [2]. Введение L-аспарагиназы вызывает задержку опухолевых клеток в G1-фазе клеточного цикла и последующую их гибель по механизму апоптоза [3, 4].

Терапевтическое использование L-аспарагиназ ограничено побочными эффектами (гепато- и нефротоксичность, панкреатиты, тромбоэмболии и др.), во многом обусловленными присущей L-аспарагиназе L-глутаминазной активностью [5, 6].

Ранее нами была выделена и охарактеризована рекомбинантная L-аспарагиназа RrA, отличающаяся небольшой молекулярной массой субъединицы (18 кДа; мономер содержит 172 аминокислотных остатка), низкой гомологией с EcA и EwA. Этот фермент

нетоксичен и его L-глутаминазная активность составляет менее 0,01% от L-аспарагиназной [7]. RrA является первой цитоплазматической L-аспарагиназой I типа, обладающей антипролиферативной активностью, свойственной, как считалось ранее, только периплазматическим аспарагиназам II типа (EcA и EwA и др.). Несомненно, что RrA обладает потенциалом для использования в заместительной терапии лейкоза в случае развития гиперчувствительности к L-аспарагиназам, используемым в клинической практике. В дальнейшем с помощью сайт-направленного мутагенеза был получен ряд мутантных форм RrA [8], характеристика некоторых из них представлены в данной работе.

Неограниченный потенциал клеточного деления обусловлен активацией теломеразы (мультибелкового комплекса), называемой также терминальной трансферазой, предотвращающей укорочение хромосом при репликации с помощью добавления теломерных повторов TTAGGG на матрице hTR (Human Telomerase RNA) [9]. Активность фермента регулируется уровнем синтеза hTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase) [10, 11].

В незлокачественных соматических клетках человека теломеразная активность обычно не определяется, но она повышена в нормальных половых и стволовых клетках, активированных лимфоцитах и большинстве типах опухолевых клеток [12, 13]. Этот факт обусловил стратегию противоопухолевой терапии, направленной на подавление активности теломеразы различными агентами [14].

Действие L-аспарагиназ как и действие ингибиторов теломеразы вызывает задержку клеточного цикла в G0/G1 фазе опухолевых клеток, подавление их пролиферации и гибель по механизму апоптоза [15, 16]. Мы предположили, что некоторые L-аспарагиназы наряду с прямым антипролиферативным действием на опухолевые клетки вследствие гидролиза L-аспарагина обладают также способностью ингибировать активность теломеразы. В настоящей работе исследовалось влияние ряда L-аспарагиназ, как цитоплазматических, так и периплазматических, в том числе и мутантных форм RrA, на активность теломеразы.

МЕТОДИКА

Реактивы

L-Аспарагин, L-глутамин, акриламид, Na₂HPO₄, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, K₂HPO₄, KCl, ДДС, Coomassie R-250 ("Serva", Германия), реактив Несслера, глюкоза "Merck" (Германия), ТХУ, HCl, CH₃COOH, CH₃COONa ("Реахим", Россия), DEAE-Toyopearl 650 ("ToyoSoda" Manufacturing Co., Япония) и Q-Sepharose ("Amersham Biosciences", США). Среды RPMI-1640 и DMEM, пропиция иодид производства фирмы "Thermo Fisher Scientific Inc." (США), МТТ – (3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолий бромид) – "Sigma-Aldrich" (США).

Ферменты и реактивы для ПЦР приобретены в "Сиб-Энзим" (Россия). Для определения молекулярной массы белков и ДНК использовали Protein molecular-weight marker #SM0431 и GeneRuler DNA ladder Mix #SM0331 ("Fermentas", Литва).

Рекомбинантная *Wolinella succinogenes* L-аспарагиназа (WsA) [17] любезно предоставлена д.б.н. Д.Г. Козловым (ГосНИИГенетика, Россия), L-Аспарагиназа EcA из *E. coli* – коммерческий препарат фирмы "Medac" (Германия).

Бактериальные штаммы и условия культивирования

Штаммы *E. coli*: XL-blue ("Stratagen", Германия) и BL21(DE3) ("Novagen", США) трансформированные плазмидой pET23 ("Invitrogen", США), несущей

ген RrA, культивировали согласно условиям описанным ранее [7, 8]. Индукцию синтеза рекомбинантной RrA осуществляли добавлением лактозы к экспрессирующей культуре при A₆₀₀ ~1,5 до конечной концентрации 0,2%. Через 14-20 ч после индукции, клетки собирали центрифугированием (5 мин, 3000 об/мин).

Получение мутантных форм RrA

Мутанты RrA получали методом QuikChange сайт-направленного мутагенеза с Single-Primer Reactions In Parallel, используя вектор pET23 ("Novagen", США), несущий RrA ген в качестве матрицы [8, 18]. Олигонуклеотиды были подобраны с помощью программы NCBI/Primer-BLAST и OligoAnalyzer 3.1 (IDT, Coralville, IA) и синтезированы компанией "ДНК-Синтез" (Россия). Праймеры для мутагенеза представлены в таблице 1.

Молекулярно-биологические работы выполняли по стандартным протоколам [19]. ПЦР проводили согласно рекомендациям компании-производителя "Сиб-Энзим" (Россия) для TaqSE ДНК-полимеразы при снижении температуры отжига до 54-51°C.

Первичный отбор мутантов осуществляли по появлению в RrA гене нового или удалению существующего рестрикционного сайта. Введение мутаций подтверждали автоматическим секвенированием ДНК [20].

Выделение L-аспарагиназ

Очистку рекомбинантной L-аспарагиназы RrA и её мутантных форм RrA_{+N17, D60K, F61L}, RrA_{+N17, A64V, E67K}, RrA_{+N17, E149R, V150P}, RrA_{E149R, V150P} и RrA_{E149R, V150P, F151T} проводили как описано ранее [7, 8] с использованием хроматографии на колонках с DEAE-Toyopearl 650M и Q-Sepharose. Рекомбинантную аспарагиназу EwA получали по разработанным нами ранее методам [21, 22]. Далее белки были обессолены, сконцентрированы на PM10 мембранах ("Millipore", Германия), стабилизированы 0,5% глюкозой и лиофилизированы. Полученные ферменты хранили при -20°C.

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные для мутагенеза и многоточечные мутантные формы RrA

Название варианта	Олигонуклеотиды*	Мутация	Изменённый сайт
RrA			[16]
RrA _{+N17, D60K, F61L}	GGATAGCCTGAAGTTA <u>ACCGAGG</u> CCTCGGTTAACTTCAGGCTATCC	+N17, D60K, F61L	HpaI MASMTGGQQMGRGSSRQ (N17)
RrA _{+N17, A64V, E67K}	CCGAGGTCGACCGCAAAGCG CGCTTTGCGGTCGACCTCGG	+N17, A64V, E67K	SalI MASMTGGQQMGRGSSRQ (N17)
RrA _{+N17, E149R, V150P}	GCTATGCACGGCAGGCCTTTTCGACCCG CGGGTCGAAAGGCCTGCCGTGCATAGC	+N17, E149R, V150P	PciI (прототип StuI) MASMTGGQQMGRGSSRQ (N17)
RrA _{E149R, V150P}	TATACATATGGCCGTTTCCCCCTCGCCC TGCTCGAGCTACTCCTGGTCGTCGATGG	E149R, V150P	PciI (прототип StuI), FauNDI (прототип NdeI), Sfr2741 (прототип XhoI)
RrA _{E149R, V150P, F151T}	CGGCAGGCCACCGACCCGGCG CGCCGGGTCGGTGGGCCIGCCG	E149R, V150P, F151T	PciI (изменён), FauNDI (прототип NdeI), Sfr2741 (прототип XhoI)

Примечание: * - сайты узнавания для рестрикционных ферментов подчеркнуты.

Определение ферментативной активности L-аспарагиназы

Активность L-аспарагиназы определяли методом прямой нессеризации [23]. За единицу активности L-аспарагиназы принимали количество фермента, катализирующее высвобождение 1 мкмоль аммиака за 1 мин при 37°C. Удельную активность выражали в международных единицах (МЕ) активности в расчёте на 1 мг белка.

ПААГ-электрофорез и определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли методом Sedmak [24], используя в качестве контроля Protein molecular-weight marker #SM0431 ("Fermentas"). Чистоту белков определяли электрофорезом в 12,5%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na по методу Лэммли [25].

Определение цитотоксической активности L-аспарагиназы

Клетки Т-лимфоblastного лейкоза Jurkat (ATCC, Manassas, VA); клетки промиелоblastного лейкоза HL-60, Т-лимфоblastного лейкоза MOLT-4 были получены в коллекции культур клеток позвоночных (Санкт-Петербург, Россия).

Клетки Jurkat и MOLT-4 выращивали в среде RPMI-1640 с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки в увлажненной атмосфере 5% CO₂/95% при 37°C. Клетки HL-60 культивировали в среде DMEM с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки.

Цитотоксичность исследовали в 96-луночных плоскодонных планшетах ("Sigma-Aldrich", США) в конечном объеме среды 200 мкл. Клетки инкубировали с различными концентрациями L-аспарагиназы в течение 72 ч. Выживаемость клеток Jurkat определяли по окрашиванию клеток пропидия иодидом и анализировали методом проточной цитометрии FACSCalibur ("Beckton Dickinson", США) [26].

Цитотоксическую активность L-аспарагиназы для клеток HL-60 и MOLT-4 определяли с помощью МТТ теста [27].

Данные представлены как средняя жизнеспособность клеток в группе \pm стандартное отклонение (N=4). Различия, оцениваемые по критерию Стьюдента считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Определение активности теломеразы и экспрессии hTERT

Активность теломеразы определяли методом TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) по методике, описанной нами ранее [28-30]. Результаты TRAP оценивали в программе GelAnalyzer 2010a.

Общую РНК клеток выделяли с помощью RNeasy Mini Kit ("Qiagen", США) согласно рекомендациям производителя. Обратную транскрипцию и ПЦР в реальном времени проводили по стандартному протоколу. Для этого 5 мкг общей РНК использовали в реакции обратной транскрипции в 25 мкл

реакционной смеси с применением Revert Aid RT Kit ("Thermo Fisher Scientific Inc.", США). Реакционная смесь для ПЦР в реальном времени была приготовлена по рецепту Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG ("Invitrogen", США). Для кДНК hTERT использовали праймеры: 5'-GTCCGAGGTGTCCCTGAGTA-3' и 5'-CAGGGCCTCGTCTTCTACAG-3'. Рибосомальную 18S РНК амплифицировали в параллельной реакции с праймерами – 5'-TTCGAACGTCTGCCSTATCAA-3' и 5'-ATGGTAGGCACGGCGACTA-3'. Все праймеры синтезированы в "Синтол" (Россия). Для амплификации использовали CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System ("Bio-Rad", США) и двухтемпературный режим реакции. Количество амплификатов определяли по флуоресценции в конце цикла элонгации. Стандартные кривые эффективности ПЦР строили по серийным разведениям (1:40, 1:80, 1:160 и 1:320) суммарных кДНК.

Данные представлены в виде нормализации уровней мРНК изучаемых генов по гену, кодирующему 18S рРНК (референсному гену с конститутивной экспрессией) (hTERT/18S мРНК) с использованием программного обеспечения CFX96.

Статистическая обработка

Статистический анализ был проведён с использованием критерия Стьюдента и программного обеспечения Statistica 6.0 ("StatSoft Inc.", США). Результаты выражали в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение мутантных форм RrA

Ген *RruA3730*, клонированный в вектор pET23 (рис. 1А) между сайтами рестрикции *HindIII* и *BamHI* кодирует составной белок RrA_{+N17} с дополнительной N-концевой аминокислотной последовательностью MASMTGGGQQMGRGSSRQ (N17) [7, 8], включающей лидирующий пептид из бактериофага T7 гена 10 (T7 tag). Присутствие T7 tag может быть использовано для мечения, очистки и характеристики белков, реакций иммуноблоттинга, иммунопреципитации и иммуноокрашивающих технологий [29]. Наши предварительные результаты показали, что составной RrA_{+N17} сохраняет каталитическую активность [7, 8].

Для выяснения влияния N17-концевого фрагмента на свойства RrA мы его удалили с помощью ПЦР и субклонировали полученную L-аспарагиназу в *NdeI/XhoI* pET23 вектор (рис. 1Б). Используемые праймеры – TATACATATGGCCGTTTCCCCCTCGCCC и TGCTCGAGCTACTCCTGGTCGTCGATGG являются специфичными к N- и C-концевым кодирующим последовательностям гена RrA. В результате удаления фрагмента N17 были получены мутанты RrA_{E149R, V150P} и RrA_{E149R, V150P, F151T}.

Другие мутации, в основном, были связаны с повышением общего и локального положительного заряда на белке, усиливающего взаимодействие с отрицательно заряженным экстрацеллюлярным матриксом и способствующим переносу белка в клетку.

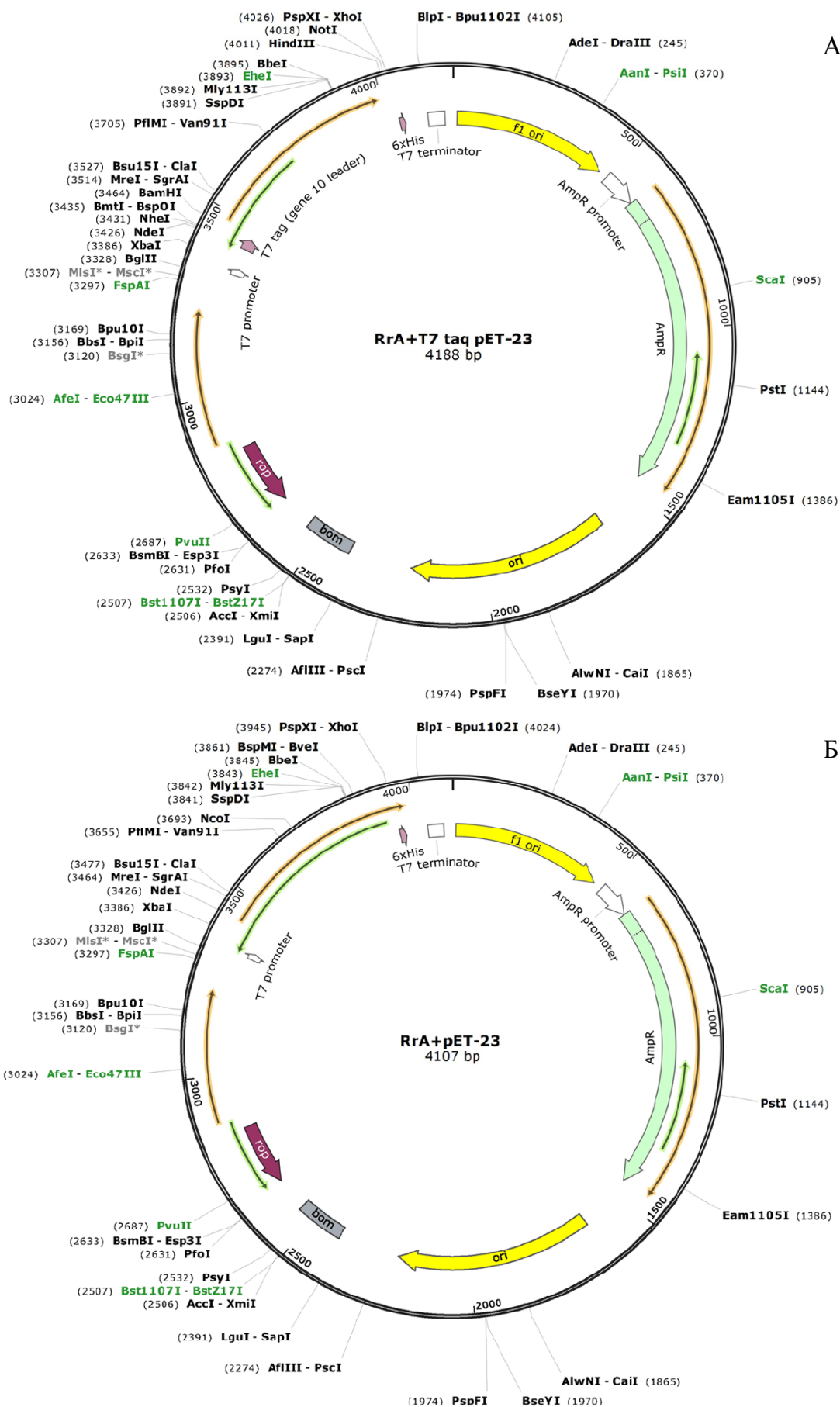


Рисунок 1. Схема плазмиды pET-23, несущей ген *RrA*+*T7 Taq* (А) и схема плазмиды с удалённым T17 фрагментом (Б).

Каталитическая активность мутанта RrA_{+N17, E149R, V150P, F151T} L-аспарагиназы была низкой и не превышала 0,02 МЕ. В дальнейшем только активные и стабильные мутанты RrA_{+N17, D60K, F61L}, RrA_{+N17, A64V, E67K}, RrA_{+N17, E149R, V150P}, RrA_{E149R, V150P} и RrA_{E149R, V150P, F151T} были очищены и исследованы. Теоретические значения (ProtParam, “<http://www.expasy.org>”) pI и локального заряда модифицированных фрагментов 146-164 и 1-17 представлены в таблице 2.

По данным электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ в присутствии ДДС-На очищенных мутантных форм RrA (рис. 2) следует, что их молекулярная масса соответствует теоретическим значениям 18 кДа (для “усечённых” версий), или 19,8 кДа (для составного белка). Содержание целевого белка, рассчитанное Gel-Proanalyzer 3.1.00.00 (“Media Cybernetics”, США) – 70-80% от общего белка.

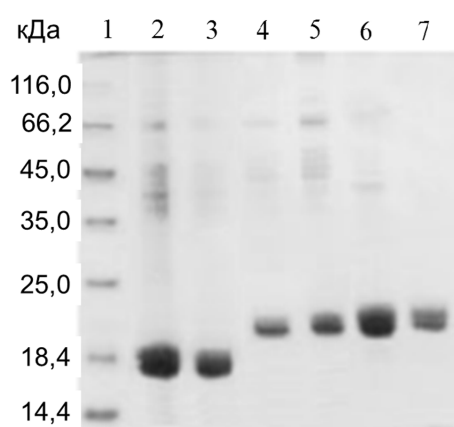


Рисунок 2. Результаты электрофореза в 12%-ном ПААГ в присутствии ДДС-На очищенных препаратов RrA. 1 - Protein molecular-weight marker #SM0431 (“Fermentas”); 2 - RrA_{E149R, V150P}; 3 - RrA_{E149R, V150P, F151T}; 4 - RrA_{+N17, D60K, F61L}; 5 - RrA_{+N17, A64V, E67K}; 6 - RrA_{+N17, E149R, V150P}; 7 - RrA_{+N17}.

Таблица 2. Теоретические значения pI белка и локального заряда фрагментов 146-164 и 1-17

Вариант RrA	Фрагмент	pI	Локальный заряд фрагментов 146-164 и 1-17, pH 7,4
Rru_A3730 Q2RMX1	HGKVFDPAKTRKNRGLGR	12,22	5,02
RrA	HGEVFDPAKTRKNRGLGR	11,4	3,021
RrA _{E149R, V150P}	HGRPFDPKTRKNRGLGR	12,49	5,021
RrA _{E149R, V150P, F151T}	HGRPTDPKTRKNRGLGR	12,49	5,021
RrA _{+N17}	MASMTGGQQMGRGSSRQ	12,49	1,985

Таблица 3. Удельная активность и максимальная нетоксическая активность L-аспарагиназы

Аспарагиназа	Удельная активность, МЕ/мг	Максимальная нетоксическая активность, МЕ/мл
EcA	200	0,05
WsA	200	0,1
EwA	300	0,1
RrA	170	0,1
RrA _{+N17N, D60K, F61L}	170	10
RrA _{+N17N, A64V, E67K}	200	1
RrA _{+N17N, E149R, V150P}	140	5
RrA _{E149R, V150P}	130	0,5
RrA _{E149R, V150P, F151T}	100	1

Делеция N-концевого дополнительного фрагмента MASMTGGQQMGRGSSRQ уменьшила удельную активность со 140 (RrA_{+N17N, E149R, V150P}) до 130 (RrA_{E149R, V150P}) МЕ/мг. Замещение F151T (RrA_{E149R, V150P, F151T}) привело к ещё большему снижению удельной активности со 130 (RrA_{E149R, V150P}) до 100 (RrA_{E149R, V150P, F151T}) МЕ/мг (табл. 3).

Цитотоксичность RrA и RrA мутантов

Для сравнения цитотоксической активности L-аспарагиназ клетки Jurkat инкубировали в течение 72 ч с вариантами RrA, а также L-аспарагиназами EcA, WsA и EwA (рис. 3). С увеличением активности вносимых в среду культивирования L-аспарагиназ EcA, WsA и EwA с 0,01 до 10 МЕ/мл число жизнеспособных опухолевых клеток снижалось на 80-90%. RrA_{+N17} и варианты RrA_{+N17, E149R, V150P}, RrA_{E149R, V150P} и RrA_{E149R, V150P, F151T} показали небольшую цитотоксичность только при высокой активности 5-10 МЕ/мл. Нативная аспарагиназа RrA обладала ещё более низкой цитотоксичностью. RrA_{+N17, D60K, F61L} и RrA_{+N17, A64V, E67K} не были токсичными даже при добавлении в среду в количестве 5-10 МЕ/мл. Для дальнейших исследований была определена максимальная нетоксичная активность L-аспарагиназ, не приводящая к статистически значимому увеличению клеточной гибели (табл. 3). При данной активности EcA, RrA и мутантные формы RrA проявляли близкую цитотоксичность, определённую с помощью МТТ-теста, в отношении культур клеток HL-60 и MOLT-4 (рис. 4).

Подавление активности теломеразы мутантными формами RrA

Для исследования способности вариантов RrA влиять на активность теломеразы мы провели TRAP анализ на клетках Jurkat, инкубированных в течение 72 ч с максимальными нетоксичными концентрациями исследуемых ферментов (табл. 3).

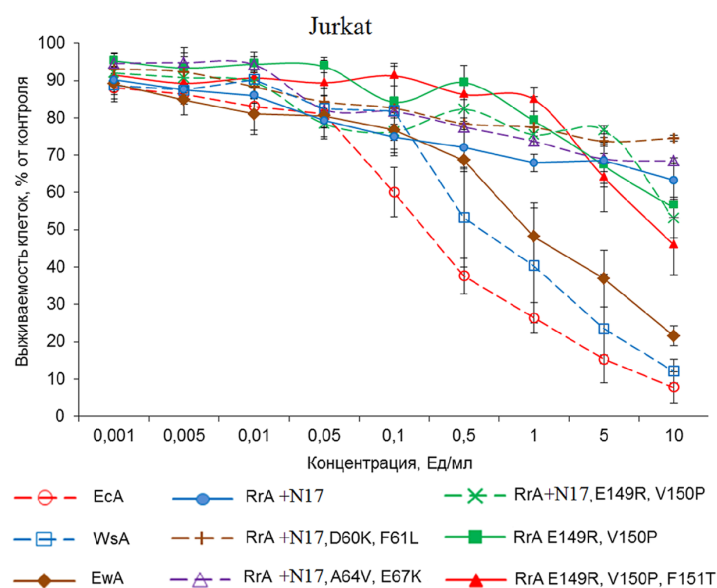


Рисунок 3. Цитотоксическая активность различных L-аспарагиназ для клеток Jurkat.

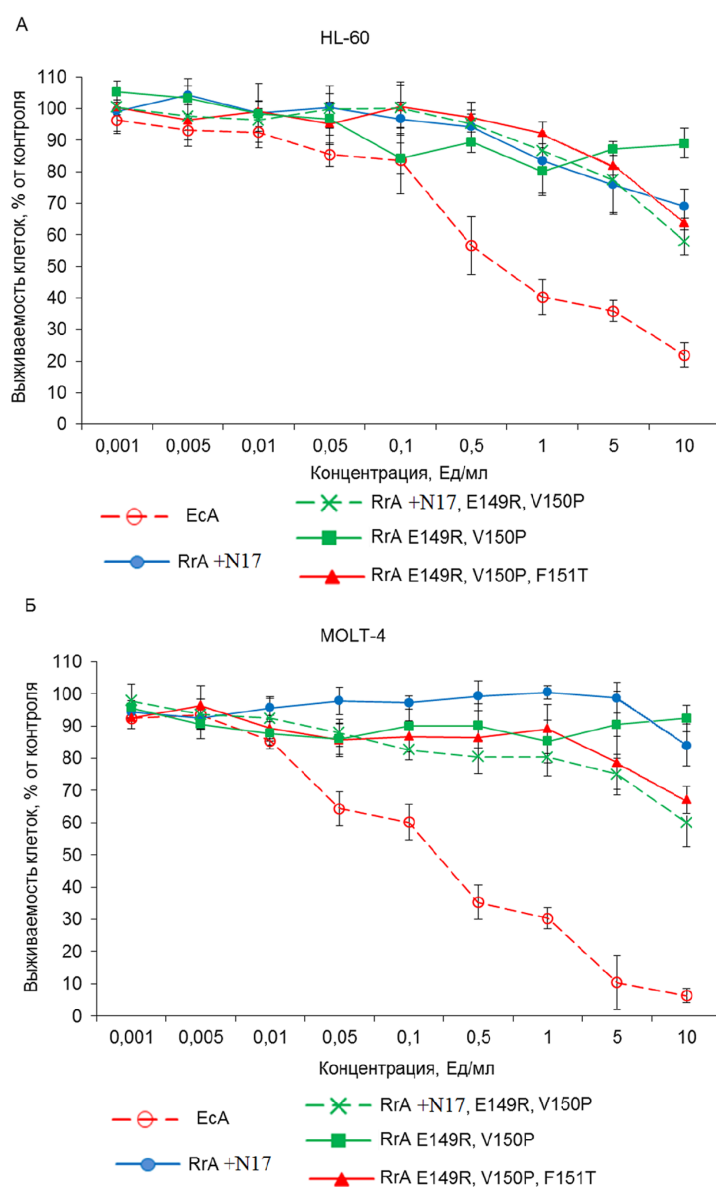


Рисунок 4. Цитотоксическая активность различных L-аспарагиназ для клеток (А) HL-60 и (Б) MOLT-4.

Оказалось, что L-аспарагиназы EcA, EwA, WsA, мутантные формы RrA_{+N17, D60K, F61L} и RrA_{+N17, A64V, E67K} не обладали способностью подавлять активность теломеразы (рис. 5). В то же время, варианты RrA_{+N17, RrA_{E149R, V150P, F151T}} и RrA_{+N17, E149R, V150P} значительно снижали теломеразную активность до уровня 12-18% от контрольной. В отличие от варианта RrA_{+N17, E149R, V150P}, мутантная форма с делецией N17 фрагмента (RrA_{E149R, V150P}) проявляла незначительную антителомеразную активность (79% от контроля). Полученные результаты позволяют предположить, что присутствие в белке T7 tag эпитопа может влиять на способность RrA подавлять теломеразную активность, несмотря на небольшой размер вставки.

Замены аминокислотных остатков E149R и V150P усиливают способность белка подавлять активность теломеразы, в то время как мутации D60K, F61L и A64V, E67K устраняют этот эффект.

Зависимость активности теломеразы от длительности действия вариантов RrA

Для исследования способности RrA и мутантных форм RrA подавлять теломеразную активность клетки Jurkat инкубировали в течение 72 ч с максимальной нетоксической дозой исследуемых L-аспарагиназ (табл. 3). Теломеразную активность определяли каждые 12 ч инкубации. Обнаружено, что RrA_{+N17} и мутантные формы RrA_{+N17, E149R, V150P} и RrA_{E149R, V150P, F151T} ингибировали теломеразную активность в течение первых 36 ч инкубации до уровня 15% от контрольного (рис. 6). При дальнейшей инкубации до 72 ч не наблюдалось увеличения ингибирующего активность теломеразы эффекта.

Статистически достоверных различий между степенью угнетения активности теломеразы RrA_{+N17} и мутантными формами RrA_{+N17, E149R, V150P} и RrA_{E149R, V150P, F151T} не установлено. Зависимость способности RrA_{E149R, V150P} подавлять активность теломеразы от времени воздействия не была

очевидной, но и этот вариант RrA мог снижать теломеразную активность до статистически достоверного уровня около 80% по сравнению с контролем после 48 ч инкубации.

Зависимость активности теломеразы от концентрации RrA и её мутантных форм

Изучена способность вариантов RrA в различных концентрациях подавлять активность теломеразы в клетках Jurkat после 48 ч инкубации. Оказалось, что RrA_{+N17} и мутантные формы RrA_{+N17, E149R, V150P} и RrA_{E149R, V150P, F151T} снижали активность теломеразы до 15-20% от контрольной при повышении концентрации до 0,05 МЕ/мл (рис. 7). При инкубации клеток Jurkat с более высокими дозами ферментов дополнительного снижения теломеразной активности не происходило. Не обнаружено достоверных статистических различий между ферментативной активностью вариантов RrA_{+N17, RrA_{+N17, E149R, V150P}} и RrA_{E149R, V150P, F151T} и их способностью подавлять теломеразу.

Влияние RrA_{E149R, V150P} на теломеразную активность не очевидно, хотя этот вариант может подавлять теломеразу до статистически значимого уровня (80% от контроля) при активности 0,01 МЕ/мл и выше.

Мутантные формы RrA не влияют на активность теломеразы в клеточных лизатах

Для определения способности мутантных вариантов RrA оказывать прямое влияние на теломеразный комплекс препараты с максимальной нетоксической активностью были добавлены к лизатам клеток Jurkat. Результаты оценены методом TRAP. Установлено, что ни один из вариантов RrA не ингибировал активность теломеразы в клеточных лизатах (рис. 8А,Б). Данный результат свидетельствует о том, что механизм подавления теломеразной активности вариантами RrA не обусловлен их прямым влиянием на теломеразный комплекс.

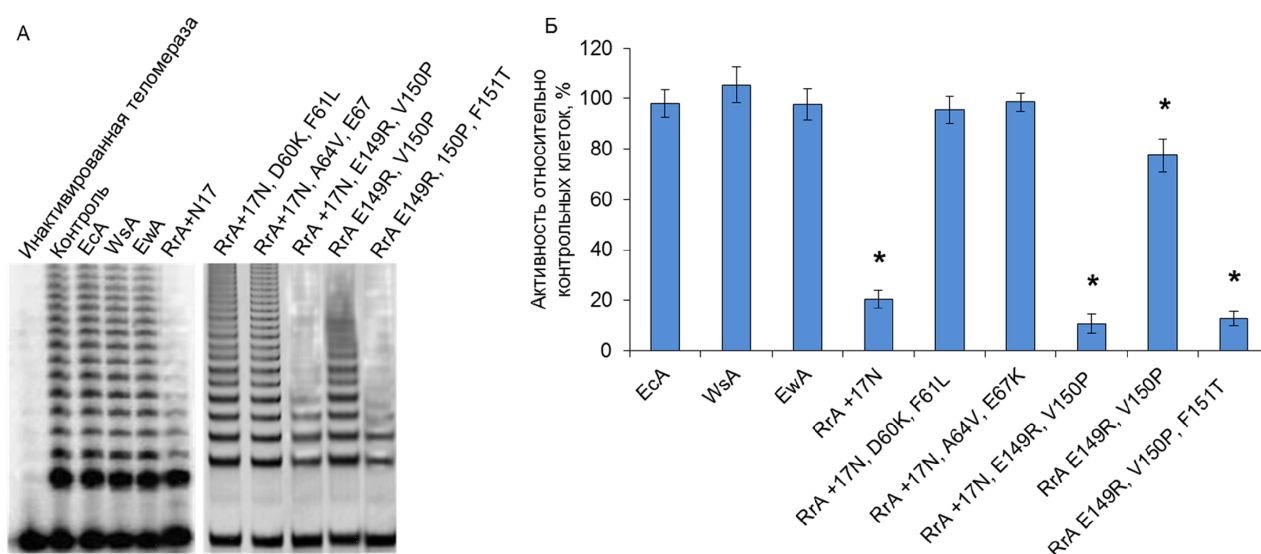


Рисунок 5. Способность L-аспарагиназ и мутантных форм RrA подавлять активность теломеразы в клетках Jurkat. (А) Активность теломеразы, определённая TRAP методом. (Б) Количественная оценка результатов TRAP.

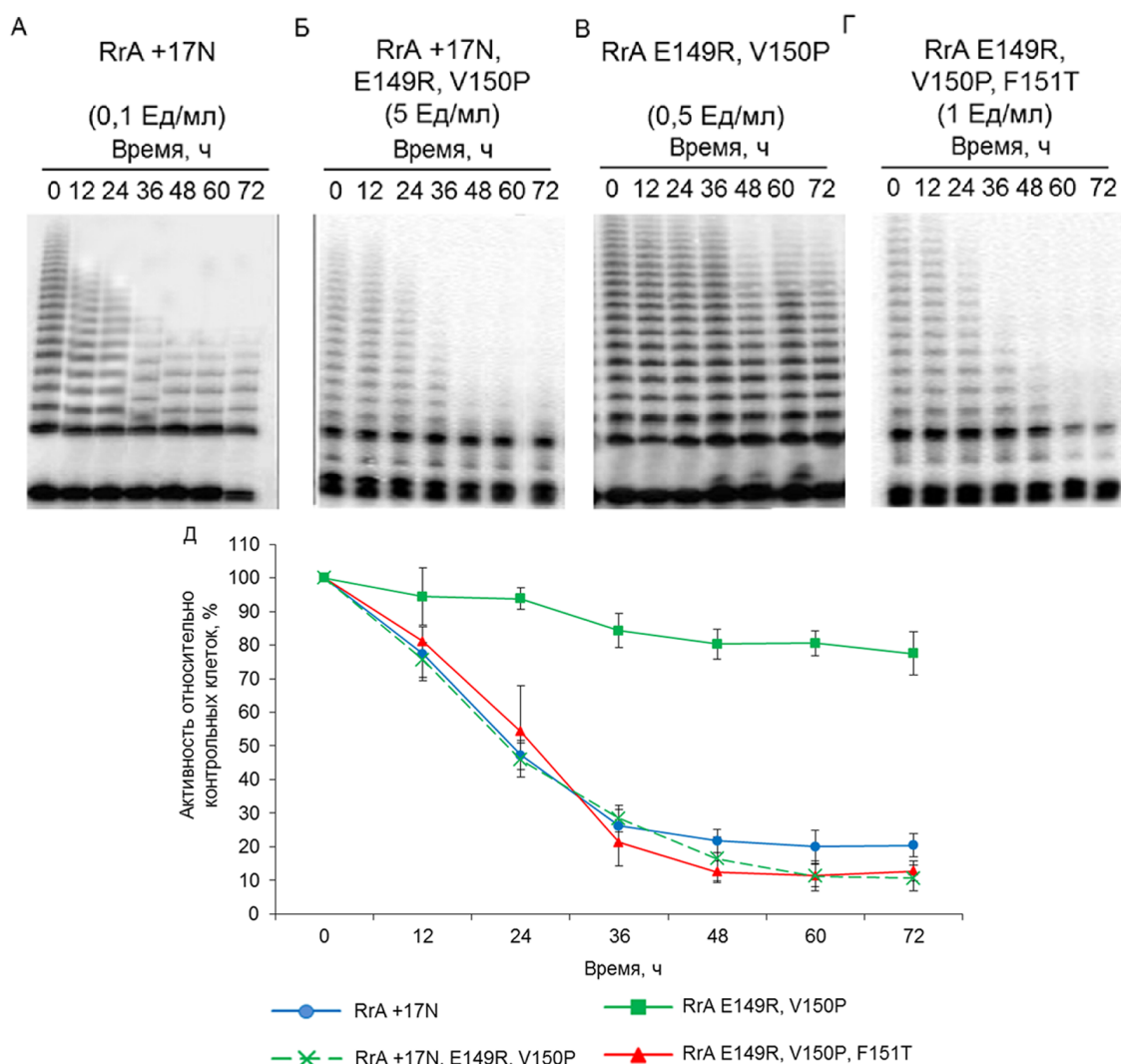


Рисунок 6. Зависимость активности теломеразы в клетках Jurkat от длительности действия RrA и мутантных форм RrA. (А-Г) Активность теломеразы, определённая TRAP методом. (Д) Количественная оценка результатов TRAP.

Влияние длительности воздействия RrA и мутантных форм RrA на экспрессию hTERT

Каталитическая субъединица теломеразы человека (hTERT) – одна из трёх основных субъединиц фермента, определяющая скорость ферментативного процесса. Сильная корреляция между экспрессией hTERT и активностью теломеразы в различных опухолях [32-34] предполагает, что активация hTERT может быть критическим событием в канцерогенезе, поэтому нами было изучено влияние RrA вариантов на экспрессию hTERT.

Мы исследовали экспрессию hTERT в клетках Jurkat, инкубированных с RrA или её мутантными формами с максимальной нетоксической активностью в двух временных точках, используя ОТ-ПЦР в реальном времени. В первые 9 ч инкубации RrA_{+N17}, RrA_{+N17, E149R, V150P} и RrA_{E149R, V150P, F151T} варианты более чем в 4 раза подавляли экспрессию hTERT по сравнению с исходным уровнем (рис. 9). При увеличении длительности инкубации до 72 ч уровень экспрессии не изменялся. Различия во влиянии RrA_{+N17}, RrA_{+N17, E149R, V150P} и RrA_{E149R, V150P, F151T} на экспрессию hTERT были статистически

незначимыми ($p \geq 0,05$). Вариант RrA_{E149R, V150P} в течение всего эксперимента вызывал лишь небольшое снижение экспрессии hTERT (не более чем на 30%).

RrA_{+N17}, RrA_{+N17, E149R, V150P} и RrA_{E149R, V150P, F151T} не были способны полностью “выключать” экспрессию hTERT и подавлять теломеразную активность (рис. 5-7, 9, 10). Минимальный сопоставимый уровень экспрессии hTERT и активности теломеразы (12-18%) проявлялся во всех экспериментах. Максимальное снижение теломеразной активности происходило с “запаздыванием” (через 36-48 ч, рис. 6), что можно объяснить использованием клетками остаточной hTERT.

Мы полагаем, что девятичасовой интервал времени, необходимый для максимального подавления экспрессии hTERT под влиянием RrA и её мутантных форм объясняется временными рамками для проникновения экзогенных препаратов RrA через клеточные и/или ядерные мембраны, активацией супрессоров экспрессии hTERT или связыванием регуляторных элементов с промоторной областью гена hTERT.

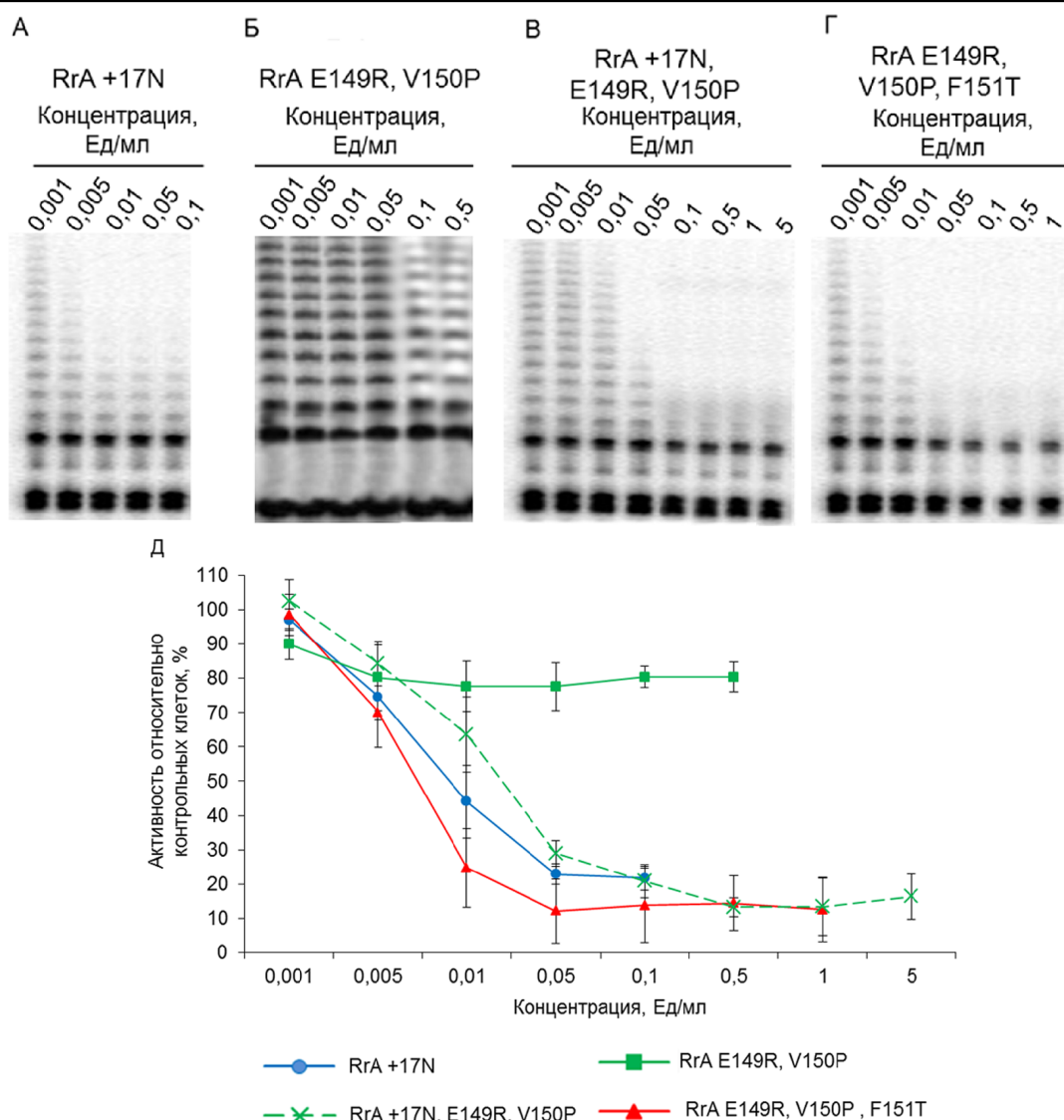


Рисунок 7. Зависимость активности теломеразы в клетках Jurkat от активности RrA и мутантных форм RrA. (А-Г) Активность теломеразы, определённая TRAP методом. (Д) Количественная оценка результатов TRAP.

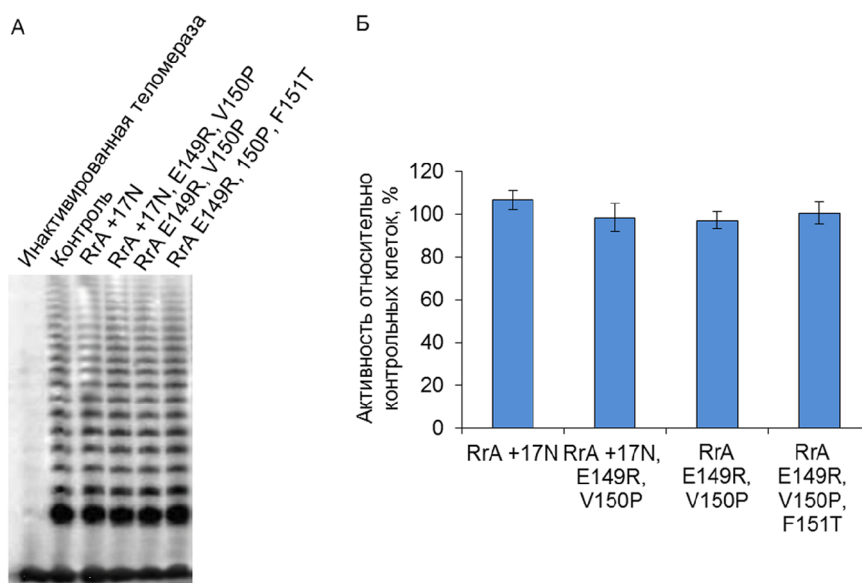


Рисунок 8. Влияние RrA вариантов на активность теломеразы в клеточных лизатах. (А) Активность теломеразы, определённая TRAP методом. (Б) Количественная оценка результатов TRAP.

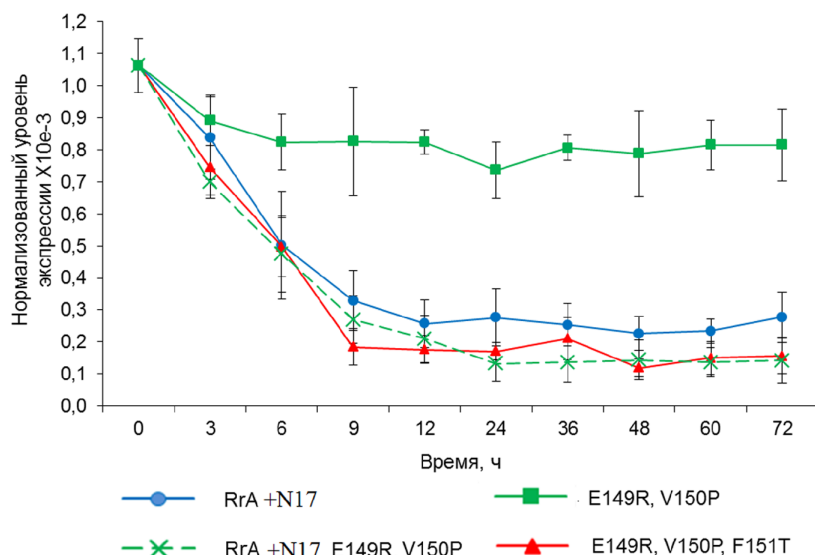


Рисунок 9. Влияние длительности воздействия вариантов RrA на экспрессию hTERT в клетках Jurkat.

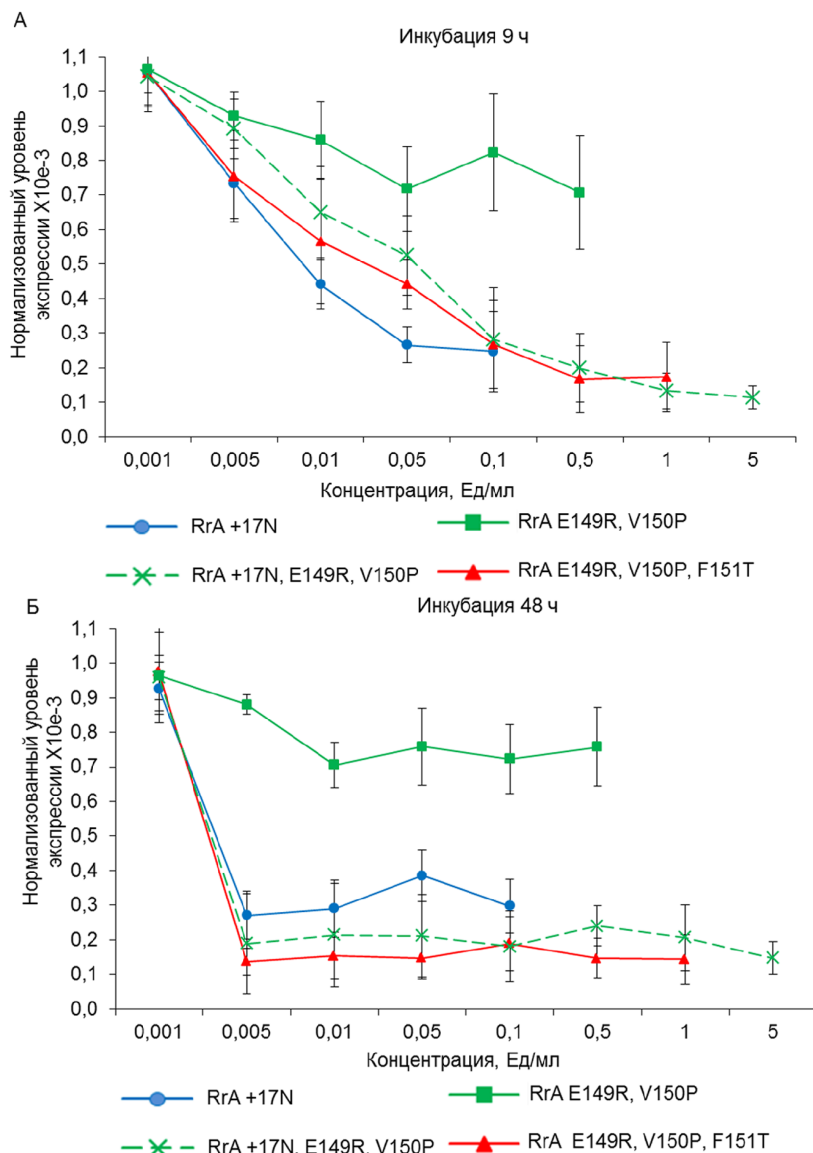


Рисунок 10. Зависимость экспрессии hTERT в клетках Jurkat от активности вариантов RrA. (А) hTERT экспрессия в клетках, инкубированных в течение 9 ч с различными концентрациями вариантов RrA. (Б) hTERT экспрессия в клетках, инкубированных 48 ч с различными концентрациями RrA и мутантных форм RrA.

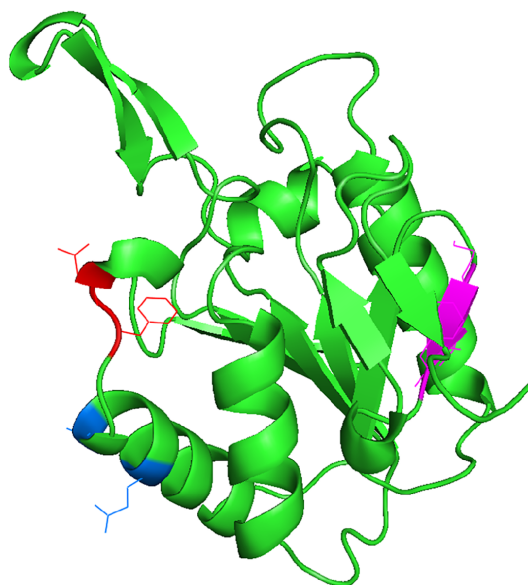


Рисунок 11. Модель трёхмерной структуры RrA [8]. Аминокислотные остатки D60 и F61, вовлечённые в мутагенез RrA_{D60K, F61L}, отмечены красным, остатки A64 и E67 замещённые в RrA_{A64V, E67K}, отмечены синим, остатки E149, V150 и F151 (RrA_{+N17, E149R, V150P} и RrA_{E149R, V150P, F151T}) – розовым. В нижней части – последовательности выравнивания для RrA (Q2RMX1), L-аспарагиназы *Erwinia chrysantemi* (P06608) и L-аспарагиназы *E. coli* (P00805):

Q2RMX1	DPFVAEVLKTARLAGAVSIVALSRKDSLDFTEADREAIGRAVGQAVEDHILLTHGTDTMV	91
P06608	INAVPEVKKLANVKGEQFSNMASENMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDTV	120
P00805	VNAVPLKDIANVKGEQVVNIGSQDMNDNVWLTAKKINTD--CDKTDGFVITHGTDME	115

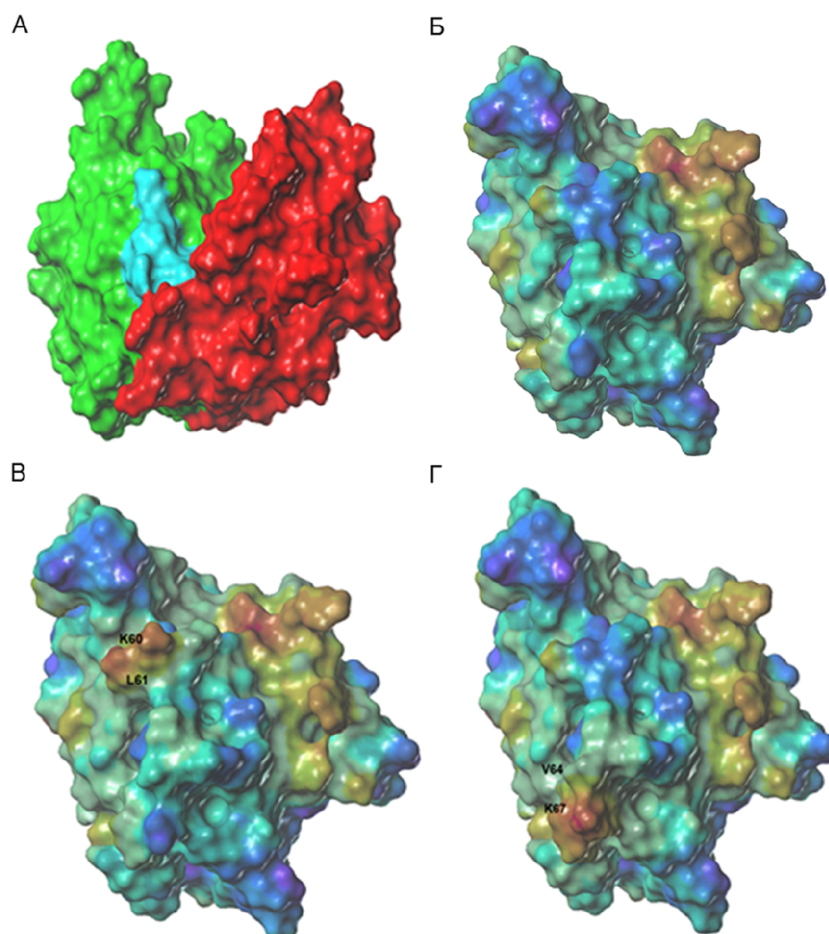


Рисунок 12. Поверхность молекул L-аспарагиназ. (А) Структура L-аспарагиназы *E. coli* (PDB id 3ECA). N-домен окрашен зелёным, С-домен – красным, аминокислотные остатки 60-67 – голубым. (Б) Модель RrA. (В) Модель RrA_{D60K, F61L}. (Г) Модель RrA_{A64V, E67K}. (Б-Г) поверхностный электростатический потенциал (отрицательный окрашен голубым, положительный – коричневым).

Зависимость степени подавления экспрессии hTERT от активности вариантов RrA

Как видно из рисунка 10А, основной процесс снижения экспрессии hTERT (более чем в четыре раза) в клетках Jurkat происходит в первые 9 ч при увеличении активности вариантов RrA от 0,005 до 0,5 МЕ/мл. Однако в параллельном опыте через 48 ч (рис. 9Б) происходило резкое подавление экспрессии hTERT до минимального уровня при концентрации 0,005 МЕ/мл (“насыщающая” доза). Повышение активности L-аспарагиназ не вызывало дальнейшего уменьшения экспрессии hTERT (рис. 10Б). Более низкая подавляющая экспрессию hTERT “насыщающая” доза (0,005 МЕ/мл), вероятно, более “точная”, так как 48 ч инкубации позволяет стабилизировать инерционную систему клетки.

Различия в способности блокировать экспрессию hTERT в зависимости от активности RrA_{+N17}, RrA_{+N17, E149R, V150P} и RrA_{E149R, V150P, F151T} были статистически не значимыми ($p \geq 0,05$) в 9 и 48-часовых временных точках наблюдения. Вариант RrA_{E149R, V150P} незначительно снижал экспрессию hTERT (не более чем на 30%) даже при концентрации 0,5 МЕ/мл в течение 9 и 48 ч инкубации.

На рис. 11 представлена ранее опубликованная модель трёхмерной структуры RrA [8] с отмеченными мутированными аминокислотными остатками. Остатки A64 и E67 локализованы в α -спирали, и остатки D60 и F61 в короткой петле соединяют две α -спирали. Фрагмент 149-151 формирует короткую β -цепь, расположенную на противоположном участке белковой глобулы. N17 фрагмент в модели отсутствует, но, поскольку этот фрагмент соединён с N-концом RrA, то он должен быть расположен вблизи от остатков A64 и E67.

Мутации в области 60-67 (RrA_{+N17, D60K, F61L} и RrA_{+N17, A64V, E67K}) привели к значительному уменьшению способности RrA подавлять экспрессию hTERT и активность теломеразы. Можно предположить, что именно эта область взаимодействует с компонентами клеток, отвечающими за этот эффект. Структура RrA эквивалентна N-домену бактериальных L-аспарагиназ [8], неспособных ингибировать теломеразную активность (рис. 5). Анализ пространственной структуры L-аспарагиназы EsA показал, что область, соответствующая остаткам 60-67 RrA, частично перекрыта C-доменом (рис. 12А), что может быть причиной неспособности двухдоменных L-аспарагиназ блокировать теломеразную активность.

Кроме того, область 60-67 в RrA, в противоположность другим L-аспарагиназам, богата кислыми аминокислотными остатками (рис. 11), формирующими отрицательно заряженный участок на поверхности RrA (рис. 12Б). Мутации в данной области разрушают этот участок (рис. 12В,Г). Можно предположить, что клеточные компоненты, взаимодействующие с RrA, являются транскрипционными факторами, в которых ДНК-связывающие сайты обогащены основными аминокислотными остатками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Несмотря на многолетнюю историю успешного применения бактериальных L-аспарагиназ в химиотерапии лейкозов, детальный механизм их противоопухолевого действия до конца не выяснен. Предполагается, что противоопухолевая активность L-аспарагиназ связана с уменьшением уровня сывороточного L-аспарагина, необходимого для выживания лейкозных клеток с недостаточной активностью L-аспарагинсинтетазы. Однако, существование активных бактериальных L-аспарагиназ, не подавляющих рост опухолей, означает, что противоопухолевые свойства могут определяться и вовлечением L-аспарагиназ в другие биохимические процессы. В настоящей работе обнаружено, что некоторые мутантные варианты короткоцепочечной цитоплазматической L-аспарагиназы I типа из *Rh. rubrum* способны подавлять экспрессию hTERT субъединицы теломеразы и, следовательно, активность теломеразы в клетках Jurkat, но не в клеточных лизатах. Изучение полученных с помощью сайт-направленного мутагенеза вариантов RrA позволило обнаружить в структуре RrA области (аминокислотные остатки 146-164, 1-17, 60-67), отвечающие за это влияние. Способность некоторых RrA вариантов подавлять в клетках экспрессию hTERT субъединицы коррелирует с их цитотоксической активностью.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем нашу искреннюю благодарность В.Н. Лазареву (НИИ физико-химической медицины, Россия) за участие в обсуждении результатов и помощь в секвенировании ДНК. Авторы благодарны д.б.н. Д.Г. Козлову (ГосНИИГенетика, Россия) за предоставление образцов WsA. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы и РФФИ (проект №15-34-70020 мол_а_мос).

ЛИТЕРАТУРА

1. Narta U.K., Kanwar S.S., Azmi W. (2007) Crit. Rev. Oncol. Hematol., **61**, 208-221.
2. Horowitz B., Madras B.K., Meister A., Old L.J., Boyes E.A., Stockert E. (1968) Science, **160**, 533-535.
3. Ueno T., Ohtawa K., Mitsui K., Koderia Y., Hiroto M., Matsushima A., Inada Y., Nishimura H. (1997) Leukemia, **11**, 1858-1861.
4. Keefer J.F., Moraga D.A., Schuster S.M. (1985) Biochem. Pharmacol., **34**, 559-565.
5. Muller H.J., Boos J. (1998) Crit. Rev. Oncol. Hematol., **28**, 97-113.
6. Ollenschlager G., Roth E., Linkesch W., Jansen S., Simmel A., Modder B. (1988) Eur. J. Clin. Invest., **18**, 512-516.
7. Покровская М.В., Покровский В.С., Александрова С.С., Анисимова Н.Ю., Андрианов Р.М., Трещалина Е.М., Пономарев Г.В., Соколов Н.Н. (2013) Биомед. химия, **59**, 192-208. doi: 10.18097/PBMC20135902192

8. 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) Mol. Biotechnol., **57**(3), 251-264.
9. Blackburn E.H. (2000) Nature, **408**, 53-56.
10. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L. (1994) Science, **266**, 2011-2015.
11. Meyerson M., Counter C.M., Eaton E.N., Ellisen L.W., Steiner P., Caddle S.D. (1997) Cell, **90**, 785-975.
12. Marian C.O., Wright W.E., Shay J.W. (2010) Int. J. Cancer, **127**, 321-331.
13. Marian C.O., Cho S.K., McEllin B.M., Maher E.A., Hatanpaa K.J., Madden C.J. (2010) Clin. Cancer Res., **16**, 154-163.
14. Jafri M.A., Ansari S.A., Alqahtani M.H., Shay J.W. (2016) Genome Med., **8**, doi: 10.1186/s13073-016-0324-x
15. Shay J.W. (2003) Clin. Cancer Res., **9**, 3521-3525.
16. Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W. (1990) Nature, **345**, 458-460.
17. Sannikova E.P., Bulushova N.V., Cheperegin S.E., Gubaydullin I.I., Chestukhina G.G., Ryabichenko V.V., Zalunin I.A., Kotlova E.K., Konstantinova G.E., Kubasova T.S., Shtil A.A., Pokrovsky V.S., Yarotsky S.V., Efremov B.D., Kozlov D.G. (2016) Mol. Biotechnol., **58**(8), 528-539.
18. Edelheit O., Hanukoglu A., Hanukoglu I. (2009) BMC Biotechnology, **9**, 1-8.
19. Green M.R., Sambrook J., MacCallum P. (2012) Molecular cloning: a laboratory manual (4th Edn), Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press ISBN 978-1-936113-41-5.
20. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) PNAS, **74**, 5463-5467.
21. Борисова А.А., Эльдаров М.А., Жгун А.А., Александрова С.С., Омелянюк Н.М., Соков Б.Н., Березов Т.Т., Соколов Н.Н. (2003) Биомед. химия, **49**(5), 502-507.
22. 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. (2015) Биомед. химия, **61**, 312-324. doi: 10.18097/PBMC20156103312
23. Wriston J.C., Yellin T.O. (1973) Adv. Enzymol., **39**, 185-248.
24. Sedmak J.J., Grossberg, S.E. (1977) Anal. Biochem., **79**, 544-552.
25. Laemmli U.K. (1970) Nature, **227**, 680-685.
26. Crowley L.C., Scott A.P., Marfell B.J., Boughaba J.A., Chojnowski G., Waterhouse N.J. (2016) Cold Spring Harbor Protoc., **7**, doi:10.1101/pdb.prot.087163.
27. Denizot F., Lang R. (1986) J. Immunol. Methods, **89**, 271-277.
28. Жоанов Д.Д., Васина Д.А., Орлова В.С., Готовцева В.Ю., Бибикова М.В., Покровский В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. (2016) Биомед. химия, **62**, 239-250. doi: 10.18097/PBMC20166203239
29. Жоанов Д.Д., Васина Д.А., Орлова Е.В., Орлова В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. (2016) Биомед. химия, **62**, 544-554. doi: 10.18097/PBMC20166205544
30. Zhdanov D.D., Fahmi T., Wang X., Apostolov Y., Sokolov N.N., Javaghdov S., Basnakian A. (2015) Cell Biology, **34**, 316-326.
31. Studier F.W., Moffatt B.A. (1986) J. Mol. Biol., **189**, 113-130.
32. Vinci S., Giannarini G., Selli C., Kuncova J., Villari D., Valent F., Orlando C. (2011) Urology Oncology, **29**, 150-156.
33. Branca M., Giorgi C., Ciotti M., Santini D., Di Bonito L., Costa S., Benedetto A., Bonifacio D., Di Bonito P., Paba P., Accardi L., Mariani L., Ruutu M., Syrjanen S., Favalli C., Syrjanen K. (2006) Diagnostic Cytopathology, **34**, 739-748.
34. Kyo S., Takakura M., Fujiwara T., Inoue M. (2008) Cancer Science, **99**, 1528-1538.

Поступила: 22. 11. 2016.
Принята к печати: 27. 01. 2017.

SUPPRESSION OF TELOMERASE ACTIVITY LEUKEMIC CELLS BY MUTANT FORMS OF RHODOSPIRILLUM RUBRUM L-ASPARAGINASE

M.V. Pokrovskaya¹, D.D. Zhdanov¹, M.A. Eldarov², S.S. Aleksandrova¹, A.V. Veselovskiy¹, V.S. Pokrovskiy¹, D.V. Grishin¹, Ju.A. Gladilina¹, N.N. Sokolov¹

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: +7(499)246-33-80; fax: +7(499)245-08-57;
e-mail: ivan1190@yandex.ru

²Research Center of Biotechnology RAS, 33 Leninsky av., Moscow, 119071, Russia

The active and stable mutant forms of short chain cytoplasmic L-asparaginase type I of *Rhodospirillum rubrum* (RrA): RrA_{+N17, D60K, F61L}, RrA_{+N17, A64V, E67K}, RrA_{+N17, E149R, V150P}, RrA_{E149R, V150P} and RrA_{E149R, V150P, F151T} were obtained by the method of site-directed mutagenesis. It is established that variants RrA_{-N17, E149R, V150P, F151T} and RrA_{E149R, V150P} are capable to reduce an expression hTERT subunit of telomerase and, hence, activity of telomeres in Jurkat cells, but not in cellular lysates. During too time, L-asparaginases of *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora* and *Wolinella succinogenes*, mutant forms RrA_{+N17, D60K, F61L} and RrA_{+N17, A64V, E67K} do not suppress of telomerase activity. The assumption of existence in structure RrA of areas (amino acids residues in the position 146-164, 1-17, 60-67) which are responsible for suppression of telomerase activity is made. The received results show that antineoplastic activity of some variants RrA is connected both with reduction of concentration of free L-asparagine, and with expression suppression of hTERT telomerase subunit, that opens new prospects for antineoplastic therapy.

Key words: L-asparaginase *Rhodospirillum rubrum*, antineoplastic effect of L-asparaginase, a site-directed mutagenesis, telomerase, hTERT subunit of telomerase