

ОБЗОРЫ

©Коллектив авторов

L-АСПАРАГИНАЗЫ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В БИМЕДИЦИНЕ

М.В. Думина¹, М.А. Эльдаров¹, Д.Д. Жданов², Н.Н. Соколов^{2*}

¹ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН,
117312, Москва, пр-т 60-летия Октября, 7/1

²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: Sokolov2144@yandex.ru

L-аспарагиназа нашла широкое применение в лечении острого лимфобластного лейкоза и ряда других лимфопролиферативных заболеваний. Помимо биотерапии фермент используется в пищевой индустрии для снижения уровня нейротоксического и канцерогенного соединения акриламида, а также для создания биосенсоров с целью анализа уровня L-аспарагина при лейкозах и в пищевой индустрии. Огромная научно-практическая значимость, имеющиеся недостатки, выявленные при использовании коммерческих препаратов L-аспарагиназ, и широкая их распространенность в природе стимулировали поиск новых источников L-аспарагиназ. Одними из наиболее перспективных в этом плане представляются экстремофильные микроорганизмы, естественными условиями обитания которых являются повышенные и пониженные температуры, высокая соленость, кислые и щелочные значения pH среды. Результаты исследований структурно-функциональных, физико-химических, кинетических характеристик, стабильности L-аспарагиназ экстремофильных микроорганизмов свидетельствуют о перспективности применения именно этих ферментов в биологии и медицине.

Ключевые слова: L-аспарагиназа; противоопухолевый препарат; экстремофильные микроорганизмы; стабильность; структурно-функциональные свойства

DOI: 10.18097/PBMC20206602105

ВВЕДЕНИЕ

L-аспарагиназа (L-аспарагин-амидогидролаза, КФ 3.5.1.1.) – первый для клинической онкогематологии бактериальный фермент со специфическим действием на опухолевые клетки. Несмотря на то, что история его изучения и применения насчитывает уже более 40 лет, он остаётся одним из основных препаратов комбинированной химиотерапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) [1, 2]. Этот фермент эффективен при лечении лимфосаркомы, лимфогранулематоза (болезни Ходжкина), острого миелоидного лейкоза, ретикулосаркомы, солидных и ряде других видов опухолей [3-11].

L-АСПаза *Escherichia coli* (EcA) вызывает полную ремиссию у 40-60% детей с ОЛЛ [12], причём ремиссия достигает 90% при комбинированном введении с другими цитостатиками [13]. На основе фермента разработаны протоколы терапии ОЛЛ [14, 15]. L-АСПаза катализирует гидролиз амидной группы боковой цепи L-аспарагина с образованием L-аспарагиновой кислоты и аммиака. L-АСПаза расщепляет также и L-глутамин, но с меньшей скоростью, чем L-аспарагин; при этом эффективность гидролиза этих субстратов зависит от источника ферментов [16].

По сродству к L-аспарагину, локализации в клетке и L-глутаминазной активности бактериальные L-АСПазы классифицируются на два типа [17]. К типу I относятся экспрессирующиеся конститутивно цитоплазматические L-АСПазы с низким сродством к L-аспарагину ($K_m=3,5 \times 10^{-3}$ М) и высоким к L-глутамину. Аспарагиназы II типа локализуются в периплазматическом пространстве, экспрессируются

в анаэробных условиях, обладают высоким сродством к L-аспарагину ($K_m=1,2 \times 10^{-5}$ М) и низким к L-глутамину [18, 19].

L-АСПаза *Erwinia chrysanthemi* (EwA) проявляет более высокое сродство к L-глутамину по сравнению с ферментом из *E. coli*: значения K_m для EcA и EwA составляют соответственно $3,7 \pm 0,2$ мМ и $10,3 \pm 0,4$ мМ [20]. Однако лишь L-АСПазы I типа обладают противоопухолевой активностью, чем и объясняется всестороннее изучение их биохимических, структурных, фармакологических и терапевтических свойств.

Механизм цитотоксического действия L-АСПазы состоит в гидролизе L-аспарагина, являющегося ключевой аминокислотой для синтеза белка и нуклеиновых кислот [21].

L-аспарагин синтезируется *de novo* ферментом аспарагинсинтетазой в реакции $L\text{-Асп} + L\text{-Глн} + \text{АТР} \rightarrow L\text{-Асн} + L\text{-Глу} + \text{АМР} + \text{Ppi}$. Особенностью ряда опухолевых клеток является низкий уровень активности аспарагинсинтазы или даже полное отсутствие данного фермента [22], что обуславливает зависимость роста и деления опухоли от уровня внеклеточного L-аспарагина. Введение фермента в организм приводит к быстрому и эффективному истощению L-аспарагина в крови и межклеточной жидкости, что вызывает избирательное подавление пролиферации раковых клеток. Считается, что снижение уровня L-аспарагина индуцирует гибель лейкозной клетки по механизму апоптоза [23, 24].

Практическая значимость L-АСПазы не исчерпывается её биомедицинским применением. В настоящее время проводятся исследования

по введению фермента в технологии пищевых производств для снижения уровня акриламида – потенциально канцерогенного и нейротоксического вещества [25-28].

Акриламид образуется в пищевых продуктах в процессе взаимодействия L-аспарагина с редуцирующими сахарами в реакции Майяра [29, 30]. Поскольку образование акриламида протекает преимущественно в условиях высокой температуры (как правило, выше 120°C) и низкой влажности из сырья с высоким содержанием углеводов, то он содержится в пищевых продуктах, полученных в результате жарки, выпечки, запекания, обжаривания или приготовления на гриле [29]. Обработка L-АСПазой выступает одним из способов снижения уровня L-аспарагина, а, следовательно, акриламида в пищевых продуктах при сохранении их органолептических характеристик [26, 28, 30-33].

Ещё одним направлением применения L-АСПазы является создание на её основе биосенсоров для диагностических целей и мониторинга содержания уровня L-аспарагина в пищевых продуктах [34-39].

Биомедицинское использование препаратов L-АСПазы не лишено проблем, связанных с побочными эффектами. К ним относятся аллергические реакции, гепатотоксичность, нефротоксичность, диабет, тромбозы, осложнения со стороны ЦНС и др. [40-44]. Применение доступных L-АСПаз в качестве добавки на пищевых производствах ограничено их невысокой активностью, недостаточной стабильностью при высоких температурах и низких значениях pH [16].

Всё это указывает на необходимость поиска новых L-АСПаз с более высокой каталитической активностью и повышенной специфичностью действия. Как уже упоминалось выше, помимо дезамидирования L-аспарагина большинство L-АСПаз могут катализировать дезамидирование L-глутамин. Именно с L-глутаминовой активностью связаны гепатотоксичность, нарушения свёртываемости крови и нейротоксичность [7-10]. Это обусловлено тем, что L-глутамин является донором аминокетид для многих биосинтетических реакций, в частности, в основном пути биосинтеза L-аспарагина в клетках млекопитающих – трансминирования L-аспарагиновой кислоты аспарагинсинтетазой [11]. Продолжительное снижение концентрации L-глутамин лишает нормальные клетки возможности избежать токсического действия фермента путём внутриклеточного синтеза L-аспарагина и приводит нарушению биохимических процессов [45].

Минимизация L-глутаминовой активности выступает одним из способов снижения токсического действия L-АСПаз, применяемых в противоопухолевой терапии.

С другой стороны, существует необходимость в L-АСПазе с повышенной стабильностью (для улучшения фармакокинетики, увеличения продолжительности циркуляции в крови) и сниженной иммуногенностью по сравнению с EwA [41]. Расширение спектра термостабильных L-АСПаз

позволит улучшить фармакокинетику препарата, увеличить продолжительность циркуляции в крови, снизить кратность дозирования и вероятность развития аллергических проявлений, а также обеспечит условия для более эффективного применения фермента в пищевой промышленности.

L-АСПазы различного происхождения отличаются по профилю иммуногенности. Известно, что EwA не обладает перекрёстной алергизирующей реактивностью с EwA [41]. Расширение спектра доступных L-АСПаз с различным эпитопным профилем позволит успешно завершать индукционный и постиндукционный этапы терапии ОЛЛ.

Возможность поиска новых L-АСПаз с улучшенными характеристиками обусловлена их широким распространением в природе. Они выделены и охарактеризованы у множества архей, бактерий, грибов, дрожжей, животных, растений [2, 16]. При этом L-АСПазы из различных источников характеризуются существенным варьированием структурно-функциональных свойств.

Последний обзор по бактериальным L-АСПазам, опубликованный в 2015 году в журнале “Биомедицинская химия” [7], касался природных, модифицированных и рекомбинантных L-аспарагиназ II типа, их выделения, конструирования продуцентов, свойств и противоопухолевой активности. Настоящий обзор обобщает результаты исследований L-АСПаз экстремофильных микроорганизмов, обитающих в условиях повышенных и пониженных температур, высокой солености, кислых и щелочных pH, как одного из наиболее перспективных источников высокостабильных вариантов фермента с характеристиками, расширяющими его применение в биотерапии, пищевой промышленности и диагностике.

1. ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ КАК ИСТОЧНИКИ L-АСПАРАГИНАЗ

Экстремофилы служат естественным источником многих высокостабильных ферментов с широкими перспективами применения в биотехнологии. Поскольку проблема стабильности мезофильных L-АСПаз является одной из ключевых, в настоящее время ведётся активный поиск их “экстремофильных” гомологов.

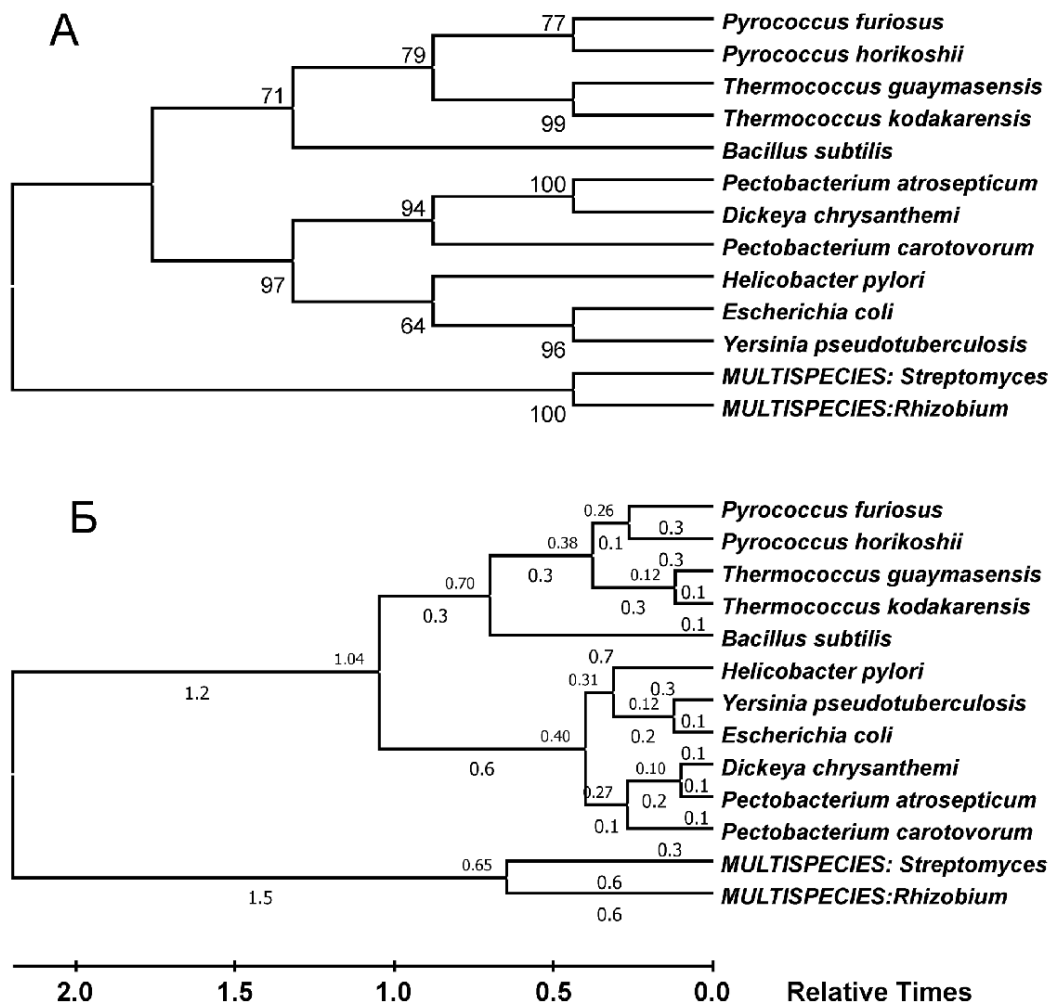
Устойчивость к экстремальным условиям внешней среды – отличительная особенность представителей архей. К настоящему времени достаточно подробно изучены L-АСПазы эвриархеот родов *Thermococcus* [46-48], *Pyrococcus* [49-54], *Archaeoglobus* [55]; кренархеот – рода *Pyrobaculum* [56].

Thermococcus – термофильные/гипертермофильные археи с широким диапазоном температур роста – 55-95°C [55]. Оптимальная температура роста гипертермофильной археи *P. furiosus* – 100°C [57], *P. calidifontis* – 90-94°C. Источником бактериальных термофильных L-АСПаз являются актиномицеты *Streptomyces thermoluteus* [58], *Thermus thermophilus* с оптимумом температуры роста 65°C [59].

Высок интерес к L-АСПамам микроорганизмов, обитающих в условиях высокой солености. Описаны L-АСПазы галотолератных бактерий родов *Bacillus* [61-64], *Staphylococcus* [65].

Мезофильные L-АСПазы характеризуются невысоким сходством аминокислотных последовательностей. Однако степень идентичности L-АСПаз экстремофильных архей родов *Thermococcus* составляет около 80% [47, 48, 66], для L-АСПазы *Rugosoccus* несколько ниже – 54-65% [47-49, 52, 54, 66] (рис. 1).

Независимо от источника, все L-АСПазы содержат высококонсервативные аминокислотные остатки (а.о.), ключевые для их каталитической активности [46, 54, 69], такие как Thr34, Tyr47, Ser80, Thr111, Asp112, Lys184 (в соответствии с последовательностью *T. gammatolerans* EJ3) [48] (рис. 2).



L-АСПАРАГИНАЗЫ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В БИМЕДИЦИНЕ

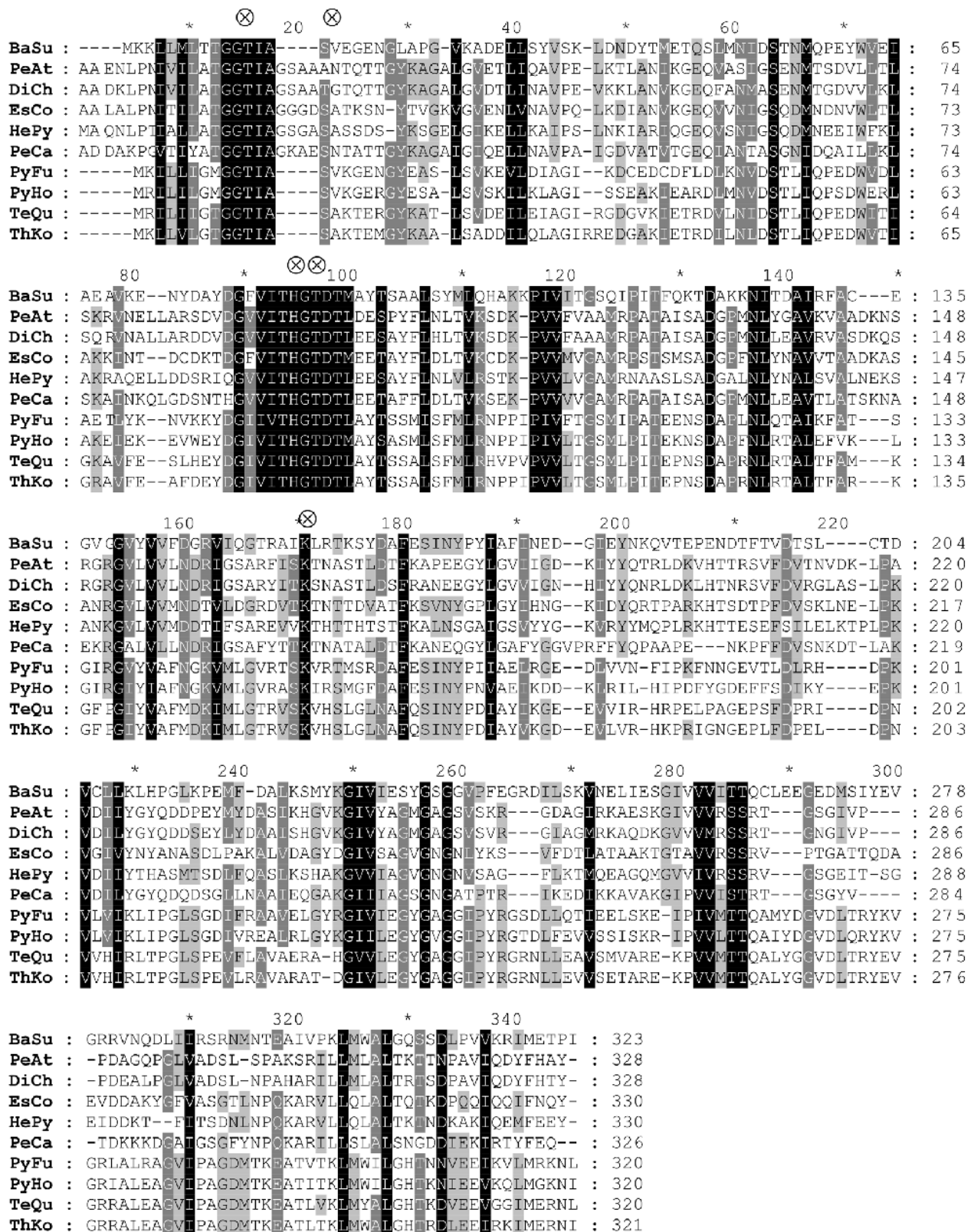


Рисунок 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей L-АсПаз. Обозначения: BaSu – AAA22243.1 [*Bacillus subtilis*], PeAt – AAS67027.1 [*Pectobacter atrosepticum*], DiCh – AAS67028.1 [*Dickeya chrysanthemi*], EsCo – QFG18892.1 [*Escherichia coli*], HePy – EIE30409.1 [*Helicobacter pylori*], PeCa – AFA36653.1 [*Pectobacterium carotovorum*], PyFu – WP_011013191.1 [*Pyrococcus furiosus*], PyHo – WP_010884185.1 [*Pyrococcus horikoshii*], ThGu – AJC70766.1 [*Thermococcus guaymasensis*], ThKo – WP_011250607.1 [*Thermococcus kodakarensis*]. Консервативные участки выделены тёмно-серым и чёрным цветом. Кружками с перекрестием выделены консервативные а.о. активного центра. Выравнивание построено с помощью программы MEGA 5 согласно [48] с модификациями.

ТкА – термостабильная L-АСПаза I типа, структура которой включает 328 а.о.; каждый мономер состоит из N- и С-концевого доменов, объединённых междоменным линкером, образованным а.о. 185-203 (рис. 3).

N-концевой домен большего размера образован 8 β -складками (β 1, β 4-8, β 11, β 12) и 4 α -спиралями (α 1-4). Складки β 2 и β 3 образуют высокоподвижную, принимающую участие в связывании субстрата бета-шпильку, придающую “открытую” или “закрытую” конформацию субъединицам ТкА. Спираль α 1, α 4 смещены к активному сайту субъединицы и, вероятно, наряду с β -шпилькой, участвуют в распознавании субстрата. β -шпильчатая структура, образованная β 9 и β 10, расположена между двумя доменами и определяет межсубъединичное взаимодействие в физиологически активной димерной форме ТкА.

Субстратная специфичность и активность L-АСПаз напрямую связаны с процессом олигомеризации. ТкА активна только в димерной форме. Распознавание субстрата и каталитическую активность обеспечивают а.о. обеих субъединиц фермента: определяющую роль играют Thr11, Tyr21, Ser54, Thr55, Thr85, Asp86 и Lys156, а также Tyr233 и Glu275, высококонсервативные для L-АСПаз.

Thr11 и Thr85 являются ключевыми а.о. активного центра L-АСПаз: Thr85, расположенный между α 3 и β 5, совместно с Thr11, локализованным в подвижной β -шпильке, осуществляет катализ посредством нуклеофильной атаки карбонильного углерода (амидной связи) субстрата.

С-концевой домен мономера ТкА – структура меньшего размера. Он образован тремя параллельными β -складками (β 3, β 15) и пятью α -спиралями (α 5 – α 9). Здесь, предположительно, расположен

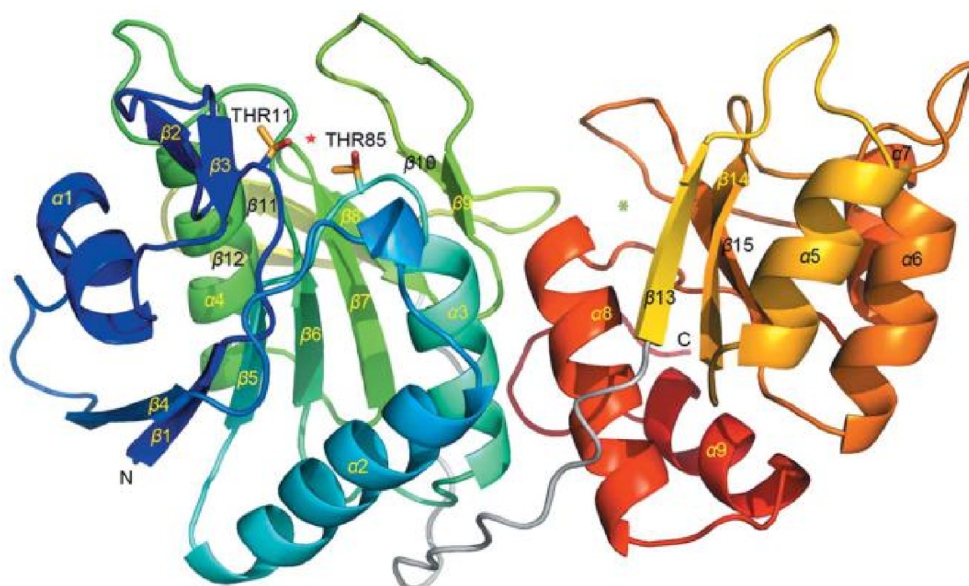
аллостерический центр, участвующий в связывании L-аспарагина и обеспечивающий переход из неактивного состояния в активное в результате кооперативного изменения конформации [70].

Аналогичное строение имеют L-АСПазы мезофильного происхождения. Каждый их мономер состоит из ~330 а.о., образующих 14 β -складок и 8 α -спиралей, организованных в легко различимые N-концевой домен большего размера и С-концевой домен, объединённые междоменным линкером ~20 а.о. [71].

Анализ имеющихся кристаллографических данных L-АСПаз различного происхождения свидетельствует о том, что, даже несмотря на невысокую степень гомологии, которая может не превышать и 30%, они имеют большое количество высококонсервативных участков, определяющих схожесть их третичных структур и механизма каталитической активности [51].

4. РОЛЬ ОТДЕЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ В СТАБИЛИЗАЦИИ СТРУКТУРЫ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ L-АСПАРАГИНАЗ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ЭНЗИМАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

Сопоставление кристаллографических данных и аминокислотных последовательностей позволило выявить две критические замены в структурах L-АСПаз *Pyrococcus* и *Thermococcus*. В исследованиях L-АСПаз PfA из *P. furiosus* и PhA из *P. horikoshii* установлено, что Lys274, взаимодействуя с Glu22 через солевой мостик и образуя водородную связь с Tyr21, способен оказывать стабилизирующее действие на петлю и ограничивать доступ субстрата к активному центру [50]. Полагают, что активность фермента напрямую связана с подвижностью петли.



В последовательности ЕсА в соответствующей позиции находится Glu283. У L-АСПаз термококков выявлены замены Glu22→Lys22 и Lys274→Glu275, которые способствуют увеличению подвижности петли, доступности активного центра для субстрата и, как следствие, повышению активности [66].

Позднее значимость замены Lys274→Glu275 у пироккокков в сравнении в термококками получила экспериментальное подтверждение. PfA с точечной мутацией Lys274Glu оказалась более активной в сравнении с ферментом дикого типа [50].

После замены Lys274Glu в последовательности PfA было выявлено отсутствие солевого мостика с Glu22 (рис. 4), что привело к увеличению каталитической

активности и снижению величины K_m в сравнении с ферментом дикого типа в 2,5 и 2 раза соответственно.

Дополнительные подтверждения того, что для L-АСПаз термофильных микроорганизмов активность обеспечивается в большей мере конформационной подвижностью, приведены в работе Li и соавт. [49]. На примере L-АСПазы *P. uyanosii* CH1 показано, что точечные мутации, приводящие к заменам а.о. в непосредственной близости к активному центру, оказывают существенное влияние на активность фермента [49]. Так, активность L-АСПазы дикого типа (1483,81 ME/мг) удалось повысить при помощи точечных мутаций Ser17Gly (2556 ME/мг), Arg156Ser (2414,33 ME/мг), Lys272Ala (1889,32 ME/мг) (рис. 5).

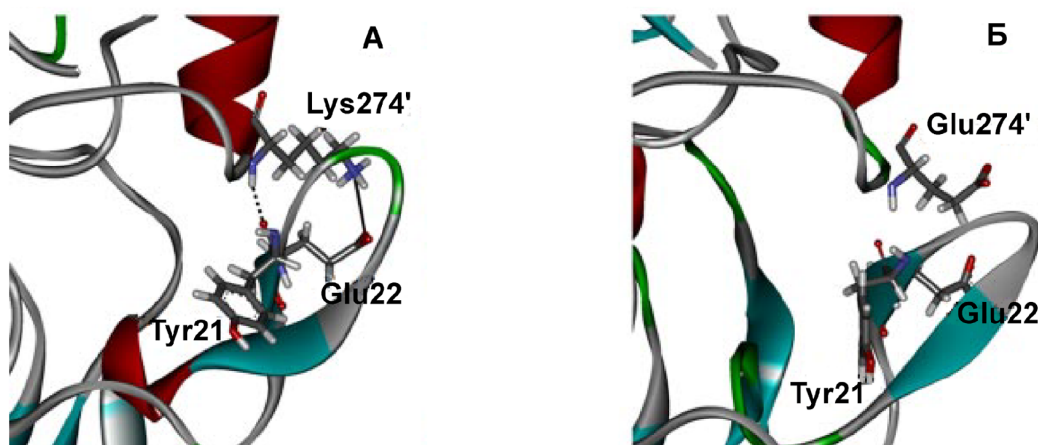


Рисунок 4. Взаимодействие а.о. в области подвижной петли активного центра L-АСПазы *P. furiosus*: А – фермент дикого типа – образование солевого мостика между Lys274 и Glu22, водородной связи между Lys274 и Tyr21; Б – фермент с точечной мутацией Lys274Glu – отсутствие солевого мостика с Glu22 и водородной связи с Tyr21 [50]. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии журнала.

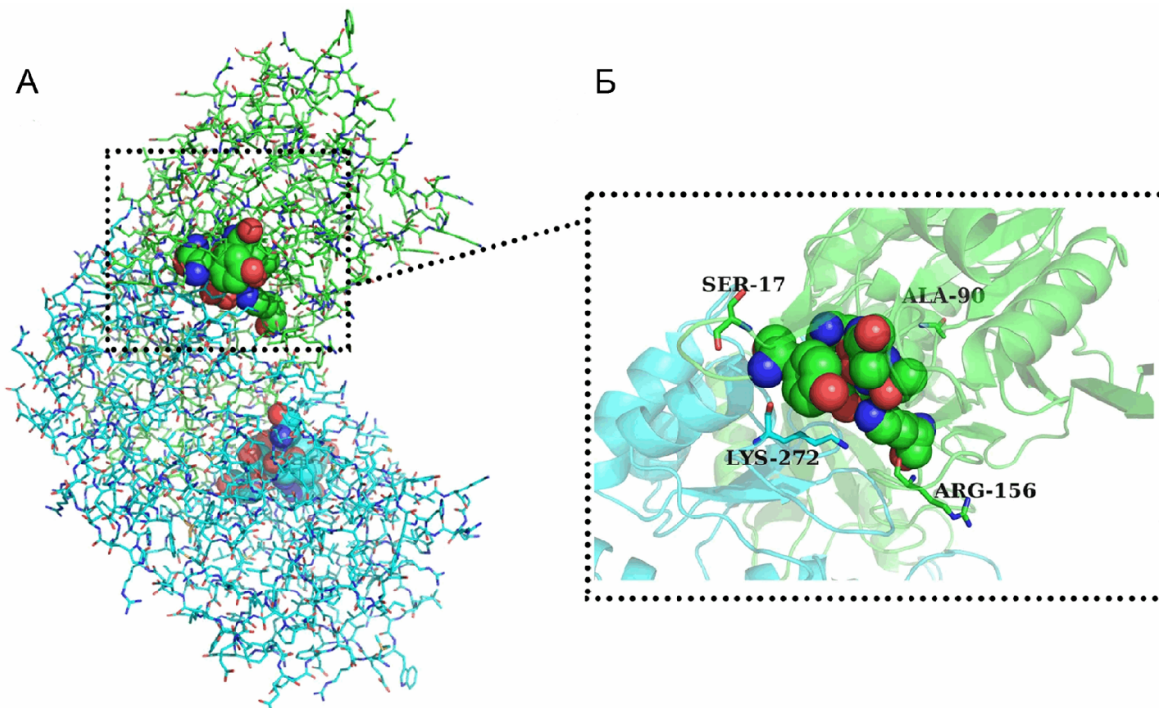


Рисунок 5. Третичная структура L-АСПазы *P. uyanosii* CH1, две субъединицы фермента выделены синим и зелёным цветом: А – общая структура, Б – область активного центра [49]. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии журнала.

Биоинформатический анализ показал, что замены Ser17Gly, Arg156Ser, Lys272Ala вблизи активного центра фермента привели к повышению его доступности для субстрата в результате снижения как стерических затруднений (Arg156Ser, Lys272Ala), так и взаимодействий между а.о. При мутации Ser17Gly Gly17 не взаимодействует с Gln22, а при замене Arg156Ser Ser156 не взаимодействует с Asn161 (рис. 6) [49].

Авторы считают, что в результате указанных мутаций произошло снижение плотности упаковки вблизи активного центра, что повысило подвижность и гибкость структуры фермента, оказало влияние на способность доменов принимать конформацию, облегчающую связывание субстрата и высвобождение

продукта реакции в сравнении с ферментом дикого типа [49].

Таким образом, для экстремофильных L-АСПаз, в частности, наиболее изученных среди них термофильных микроорганизмов, характерна плотная “упаковка” за счёт взаимодействий, приводящих к дополнительной стабилизации структуры. Снижение количества взаимодействий между а.о., равно как стерических затруднений, может приводить к увеличению гибкости структуры фермента, что позволяет легко переходить в конформационное состояние с повышенной доступностью для субстрата. Ключевую роль в обеспечении доступности активного центра для субстрата играет подвижность петли, закрывающей вход в активный центр L-АСПаз [49].

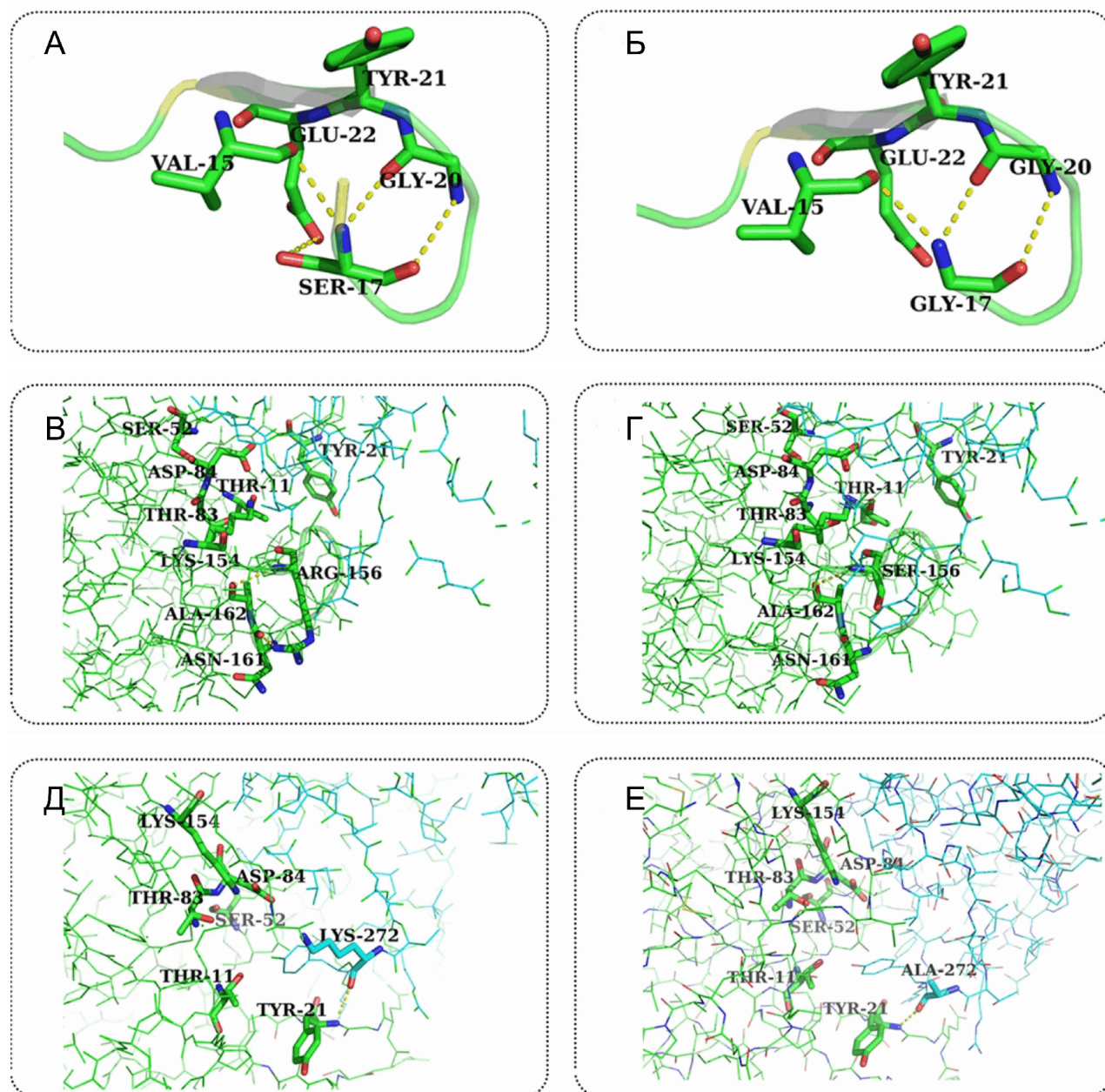


Рисунок 6. Третичная структура области вблизи активного центра L-АСПазы *P. yayanosii* CH1: А, В, Д – фермент дикого типа; Б, Г, Е – ферменты с мутациями Ser17Gly, Arg156Ser, Lys272Ala соответственно [49]. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии журнала.

5. ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ Л-АСПАРАГИНАЗ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Процесс олигомеризации является ключевым в формировании структуры активных центров Л-АСПазы и её субстратной специфичности, поскольку фермент активен только в олигомерной форме. Большинство мезофильных Л-АСПаз, среди которых EcA [72], EwA [20, 73, 74], Л-АСПазы *Helicobacter pylori* CCUG 17874 [75], *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428 [76], существуют в виде гомотетрамеров с молекулярной массой 140-150 кДа [77-79].

В то же время Л-АСПазы экстремофильных микроорганизмов, в отличие от мезофильных, активны преимущественно в димерной форме. Гомодимерами являются Л-АСПазы *S. thermoluteus* subsp. *fuscus* NBRC 14270 [58], *Staphylococcus* sp. OJ82 [65], термофильных архей *P. horikoshii* OT3 [54], *P. furiosus* DSM 3638 [52], *T. kodakaraensis* KOD1 [47], *T. gammatolerans* EJ3 [48], *T. zilligii* [66], *P. calidifontis* [56]. Как и у Л-АСПаз мезофильных микроорганизмов, каждый мономер, размером в 35 кДа, состоит из N- и C-концевого доменов, объединённых междоменным линкером [47, 48, 66, 70].

Однако среди экстремофильных бактерий обнаружены также Л-АСПазы в мономерной (Л-АСПазы *T. aquaticus* T351 [80]) и гексамерной (Л-АСПазы *T. thermophiles* HB8 [59]) формах. Галотолерантные Л-АСПазы, продуцируемые бактериями рода *Bacillus*, активны в тетрамерной форме [61].

К настоящему времени изучены особенности формирования четвертичной структуры у термофильных Л-АСПаз. Особый интерес к олигомеризации Л-АСПаз микроорганизмов, обитающих в условиях повышенных температур, продиктован не только тем, что она определяет активность ферментов (активные центры расположены в зоне контакта субъединиц), но также и тем, что для белков с высокой гидрофобностью в условиях повышенных температур велика вероятность формирования агрегатов при сборке, в связи с этим механизм олигомеризации может являться эволюционной адаптацией, позволяющей избежать накопления этих агрегатов [51].

Особенности олигомеризации гомодимерной аспарагиназы PfA как одной из Л-АСПаз гипертермофильных микроорганизмов описаны в серии работ Garg и соавт. [51, 53]. Установлено, что определяющую роль в сборке PfA играет более стабильный N-концевой домен. Процесс протекает последовательно: часть полипептидной цепи, образующая N-концевой домен, сворачивается и формирует стабильный кор, после чего происходит сворачивание C-концевого домена. Для аспарагиназы PfA фолдинг доменов и их ассоциация сопряжены, что обуславливает высокую кинетическую стабильность и предотвращает агрегацию.

Термическая устойчивость и высокая активность при повышенных температурах объясняется сильным межсубъединичным взаимодействием.

Анализ структуры фермента PfA показывает, что мономеры ориентированы "голова-к-хвосту", где N-концевой домен мономера (NPfAI) связан с C-концевым доменом (CPfAI), причём совокупные межмономерные взаимодействия NPfAI-CPfAI, CPfAI-CPfAI и NPfAI-CPfAI более сильны, чем внутримonomерные [53]. Показано, что число солевых мостиков в зоне контакта между мономерами превышает их количество внутри мономера NPfA-CpfA [53]. Электростатическое взаимодействие (типа солевой мостик), наряду с гидрофобными взаимодействиями, вносит значительный вклад в стабилизацию олигомерного комплекса.

Показано, что димер PfA в присутствии гуанидин хлорида диссоциирует на мономеры в развёрнутой конформации [52], а снижение pH до 2,0 приводило к диссоциации PfA на мономеры в свёрнутой конформации. Такие мономеры термодинамически и кинетически нестабильны и легко переходят в состояние амилоидных фибрилл [52].

Таким образом, для гипертермофильной PfA сопряжённый процесс сворачивания и олигомеризации, по-видимому, является эволюционной адаптацией, позволяющей избежать накопления частично свёрнутых мономерных интермедиатов с высокой вероятностью агрегации в условиях повышенных температур [51].

Следует отметить, что особенности четвертичной структуры Л-АСПаз экстремофильных микроорганизмов представляют как фундаментальный, так и огромный практический интерес. Существование большинства экстремофильных Л-АСПаз в активной димерной форме, в отличие от тетрамерной для мезофильных гомологов, открывает дополнительные перспективы для их применения в клинической онкогематологии.

Мультисубъединичная структура и большая молекулярная масса фермента повышают вероятность аллергических проявлений: иммунная система активно реагирует на появление в крови большого количества чужеродного белка [16, 81, 82]. Таким образом, есть основания полагать, что новые препараты Л-АСПаз со сниженной молекулярной массой в активной димерной форме будут обладать меньшей иммуногенностью в сравнении с известными гомотетрамерными Л-АСПазами мезофильных микроорганизмов.

6. СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ Л-АСПАРАГИНАЗ

Большинство мезофильных Л-АСПаз бактериального происхождения катализируют гидролиз как Л-аспарагина, так и Л-глутамина. Поскольку токсические эффекты Л-АСПазы во многом связывают с высокой Л-глутаминазной активностью, субстратная специфичность фермента, соотношение Л-аспарагиназной и Л-глутаминазной активности предопределяют перспективность их терапевтического использования.

Для препаратов L-АСПаз относительная скорость гидролиза L-глутамин по отношению к таковой для L-аспарагина составляет ~10% у EwA и порядка 2% у EcA [15, 83-86].

В исследованиях экстремофильных микроорганизмов обнаружены L-АСПазы с различной субстратной специфичностью. Фермент TkA из *T. kokadarensis* проявлял высокую L-аспарагиназную активность и не расщеплял L- и D-глутамин [47]. TkA гидролизовала D-аспарагин со скоростью, составляющей 50% от таковой для L-аспарагина. В то же время, для L-АСПазы *T. gammatolerans* EJ3, степень гомологии которой с TkA составляет 79%, выявлена достаточно высокая активность L-аспарагиназы и L-глутаминазы: 7622 ME/мг и 2926 ME/мг белка соответственно при оптимальных условиях – 850°C, pH 8,5 [48]. Показано, что L-АСПаза *T. gammatolerans* EJ3, помимо L-аспарагина, гидролизует D-аспарагин с активностью, составляющей 50% от активности при использовании в качестве субстрата L-аспарагина.

В исследованиях L-АСПаз эвриархеот *P. furiosus* [52], а также кренархеот *P. calidifontis* [56] L-глутаминазная активность не обнаружена. Фермент из *P. calidifontis* гидролизует D-аспарагин со скоростью, составляющей 20% от таковой для L-аспарагина.

Активность L-АСП термофильной археи *A. fulgidus* в отношении L-аспарагина была выше, чем для D-аспарагина и L-глутамин – в 5 и 4 раза соответственно [55]. У L-АСПазы термофильной актинобактерии *S. thermoluteus* subsp. *fuscus* NBRC 14270 также была обнаружена активность L-глутаминазы, составлявшая 1% от L-аспарагиназной [58].

При поиске L-АСПаз психрофильных микроорганизмов, не обладающих L-глутаминазной активностью, наиболее активный фермент (20,57 ME/мг) был обнаружен у грибоного штамма *Trichosporon asahii* IBBLA1 [60].

L-АСПаза галотолерантной *B. subtilis* 168 гидролизовала L-глутамин, D-аспарагин, и L-глутамин со скоростью, составлявшей 21,8%, 0,4% и 0,4% соответственно от таковой для L-аспарагина [61].

Таким образом, среди экстремофильных микроорганизмов обнаружены как L-АСПазы, не обладающие L-глутаминазной активностью, так и ферменты, гидролизующие, наряду с L-аспарагином, и L-глутамин.

В исследовании Bansal и соавт. [50] отмечается, что отсутствие L-глутаминазной активности у термофильной L-аспарагиназы PfA может быть обусловлено относительно плотной упаковкой и жёсткой структурой активного центра фермента, препятствующими прохождению дополнительной, в сравнении с L-аспарагином, CH₂-группировки L-глутамин [50]. Действительно, Offman и соавт. [87] показали, что повышение компактности тетрамера EcA и уменьшение объёма полости активного центра приводят к снижению L-глутаминазной активности. Полученные в работе двойные мутанты

Asn24Ala/Tyr250Leu практически не обладали L-глутаминазной активностью при остаточной L-аспарагиназной активности порядка 72%.

Учитывая структурные различия данных субстратов и особенности их связывания с активным центром фермента, описан ещё ряд примеров минимизации L-глутаминазной активности генно-инженерным путём. Так, Derst и соавт. [88] показали, что для нативной EcA а.о. Asn248 оказывает влияние на субстратную специфичность, его замена на Ala позволяет снизить L-глутаминазную активность [88]. Однако, несмотря на то, что данный а.о. находится вне активного центра, мутация привела к снижению L-аспарагиназной активности до 12%. Ardalan и соавт. удалось повысить энергию связывания L-глутамин EcA с помощью мутации Val27Thr [89].

Учитывая то, что все известные к настоящему времени генно-инженерные попытки изменить субстратную специфичность фермента приводили преимущественно к частичному уменьшению, но не к полной элиминации L-глутаминазной активности и при этом сопровождались снижением активности L-аспарагиназы, несомненно, что L-АСПазы экстремофильных микроорганизмов, свободные от L-глутаминазной активности, приобретают важный научно-практический интерес.

7. ЭНЗИМАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ L-АСПАРАГИНАЗ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

L-АСПазы экстремофильных микроорганизмов проявляют максимальную активность в условиях, существенно отличающихся от физиологических, что расширяет возможности их использования, в частности, в высокотемпературных процессах в пищевой промышленности. Тем не менее, повышенная стабильность данных ферментов позволяет им конкурировать и с L-АСПазами мезофильных микроорганизмов в относительно мягких реакционных условиях.

Сравнение экспериментальных данных для L-АСПаз экстремофилов показывает, что наиболее высокой активностью обладают гомологи архейного происхождения. L-АСПаза *T. kodakaraensis* KOD1 проявляет максимальную L-аспарагиназную активность при pH 9,5 и температуре 85°C (табл. 1). Несмотря на то, что в физиологических условиях (при 37°C) активность фермента составляет 94 ME/мг, то есть 4% от максимальной, это значение превышает результаты, полученные для мезофильной EcA – 73 ME/мг [47, 90].

Согласно экспериментальным данным, активность L-АСПазы из *T. zilligii* в оптимальных условиях 90°C и pH 8,5 составляет 5278 ME/мг (табл. 1), при 40°C значение снижается до 431 ME/мг, однако это также превышает активность EcA [66].

Ещё большей активностью обладают L-АСПазы *T. gammatolerans* EJ3, *P. furiosus* DSM 3638, *T. kodakaraensis* KOD1 – 7622 ME/мг, 550 ME/мг и 2350 ME/мг соответственно (табл. 1).

L-АСПАРАГИНАЗЫ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В БИМЕДИЦИНЕ

Таблица 1. Кинетические характеристики L-аспарагиназ

Микроорганизм	Олигомер / молекулярная масса мономера, кДа	Оптимальные условия		Гидролиз L-аспарагина, МЕ/мг	Гидролиз L-глутамина, МЕ/мг	Кинетические показатели реакции гидролиза L-аспарагина	Источник
		t,°C	pH				
Мезофильные бактериальные L-аспарагиназы							
L-аспарагиназа II <i>Escherichia coli</i> (EC ASNase)	Тетрамер / 38	68,2	8,0-9,0	41,41	+ 4,06	$K_m=0,34\pm0,06$ мМ $V_{max}=44,59\pm2,27$ мкМ×мин ⁻¹ ×мг ⁻¹	[59]
<i>E. coli</i>	Тетрамер	37,0	8,0			$K_m=0,01$ мМ	[115]
<i>E. coli</i> -PEG	Тетрамер	37,0	8,0			$K_m=0,005$ мМ	[115]
<i>E. coli</i> K-12	Тетрамер					$K_m=0,006$ мМ $k_{cat}=7,727$ с ⁻¹	[63]
<i>E. coli</i> (Merck Elspar®)	Тетрамер	35,0	8,0	270,0		$K_m=0,13$ мМ $k_{cat}=126,5$ с ⁻¹ $k_{cat}/K_m=9,73\times10^2$ мМ ⁻¹ ×с ⁻¹	[116]
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Тетрамер	37,0	8,0			$K_m=0,06$ мМ	[117]
<i>E. chrysanthemi</i> 3937	Тетрамер					$K_m=0,058$ мМ $k_{cat}=2,38\times10^4$ с ⁻¹ $k_{cat}/K_m=4,12\times10^5$ мМ ⁻¹ ×с ⁻¹	[68]
<i>E. chrysanthemi</i> (IPsen (Erwinase®))	Тетрамер		8,5			$K_m=0,09$ мМ $k_{cat}=286,2$ с ⁻¹ $k_{cat}/K_m=3,18\times10^3$ мМ ⁻¹ ×с ⁻¹	[116]
<i>Erwinia carotovora</i> NCYC 1526	Тетрамер					$K_m=0,085$ мМ $k_{cat}=3,14\times10^4$ с ⁻¹ $k_{cat}/K_m=3,69\times10^5$ мМ ⁻¹ ×с ⁻¹	[68]
<i>Bacillus subtilis</i> B11-06	Тетрамер	40,0	7,5	92,45		$K_m=0,43$ мМ	[91]
Галотолерантные бактериальные L-аспарагиназы							
<i>B. subtilis</i> 168	Тетрамер / 36	65,0	8,0	45,4	следовой (0,4%)	30°C $K_m=2,06$ мМ $k_{cat}=98,6$ с ⁻¹ $k_{cat}/K_m=480$ мМ ⁻¹ ×с ⁻¹	[62]
<i>Bacillus</i> sp. SL-1.	Тетрамер	37,0	8,6		—	$K_m=0,01$ мМ $k_{cat}=23,96$ с ⁻¹	[63]
<i>Staphylococcus</i> sp. OJ82	Гомодимер / 37,5	37,0	8,0-9,0	113,06		$K_m=2,2$ мМ	[118]
Термофильные бактериальные L-аспарагиназы							
<i>Streptomyces thermoluteus</i> subsp. fuscus NBRC 14270	Димер / 35	63,6	8,0-9,0	68,09	+ 0,65	$K_m=1,83\pm0,22$ мМ $V_{max}=92,73\pm4,30$ мкМ×мин ⁻¹ ×мг ⁻¹	[59]
<i>Thermus thermophilus</i>	Гексамер / 33	≥70	9,2	840,0	—	$K_m=2,8$ мМ	[60]
<i>Thermus aquaticus</i> T351	Мономер / 80	75,0	9,5	585,0		$K_m=8,6$ мМ	[81]
Термофильные архейные L-аспарагиназы							
<i>Pyrobaculum calidifontis</i>	Димер / 32	≥100	6,5		следовой	$K_m=4,5\pm0,4$ мМ $V_{max}=355\pm13$ мкМ×мин ⁻¹ ×мг	[57]
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>		70,0	9,2		+	37°C $K_m=0,08$ мМ 70°C $K_m=0,005$ мМ	[56]
<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1	Димер / 38	90,0	8,0	978,7	—	$K_m=2,6$ мМ $V_{max}=1121$ мМ×мин ⁻¹ ×мг ⁻¹ $k_{cat}=694$ с ⁻¹	[70]
<i>T. kodakarensis</i> KOD1	Гомодимер / 35,5	85,0	9,5	2350,0	—	$K_m=5,5$ мМ $V_{max}=3300$ мкМ ×мин ⁻¹ ×мг ⁻¹ $k_{cat}=1397$ с ⁻¹ $k_{cat}/K_m=254$ мМ ⁻¹ ×с ⁻¹	[101]

Таблица 1. Кинетические характеристики L-аспарагиназ (продолжение)

Микроорганизм	Олигомер / молекулярная масса мономера, кДа	Оптимальные условия		Гидролиз L-аспарагина, МЕ/мг	Гидролиз L-глутамина, МЕ/мг	Кинетические показатели реакции гидролиза L-аспарагина	Источник
		t, °C	pH				
<i>Thermococcus zilligii</i>	Гомодимер / 36	90,0	8,5	5278±32		$K_m=6,08 \text{ мМ}$ $k_{cat}=3267 \text{ с}^{-1}$ $k_{cat}/K_m=537,3 \text{ мМ}^{-1}\times\text{с}^{-1}$	[48]
<i>Thermococcus gammatolerans</i> EJ3	Гомодимер / 35	85,0	8,5	7622,0	+ 2926	$K_m=10,0 \text{ мМ}$ $k_{cat}=5721 \text{ с}^{-1}$ $k_{cat}/K_m=572,1 \text{ мМ}^{-1}\times\text{с}^{-1}$	[49]
<i>Pyrococcus yayanosii</i> CH1	Гомодимер / 36,1	95,0	8,0	1483,8		$K_m=6,5 \text{ мМ}$ $V_{max}=2929 \text{ мкМ} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$	[50]
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Гомодимер / 37	80,0	8,2	550,0	—	80°C $K_m=12,1\pm0,05 \text{ мМ}$ $k_{cat}=888,6 \text{ с}^{-1}$ $k_{cat}/K_m=72,5 \text{ мМ}^{-1}\times\text{с}^{-1}$ 37°C $K_m=8,12\pm0,3 \text{ мМ}$ $k_{cat}=17,98 \text{ с}^{-1}$	[53]
Психрофильные грибные L-аспарагиназы							
<i>Trichosporon asahii</i> IBBLA1		30,0	7,0	20,57			[61]

В сравнении с L-АСПазами архей, активность “экстремофильных” гомологов бактериального и грибного происхождения снижена на 1-2 порядка.

Активность L-АСПазы психрофильного микроорганизма *T. asahii* IBBLA1 в оптимальных условиях – 30°C, pH 7,0 – составляет 20,57 МЕ/мг [60]; галотолерантных бактерий *B. subtilis* 168 [61] и *Staphylococcus* sp. OJ82 – 45,4 и 113,06 МЕ/мг соответственно. Однако даже при относительно невысокой активности они в ряде случаев превосходят мезофильные L-АСПазы. Так, фермент термофильной бактерии *S. thermoluteus* subsp. fuscus NBRC 14270 по эффективности гидролиза L-аспарагина при 37°C превосходит EcA: 68,09 vs. 41,41 МЕ/мг (табл. 1) [58].

8. ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ L-АСПАРАГИНАЗ

Известно, что ионы металлов могут оказывать существенное влияние на активность L-АСПазы. Изучение влияния ионов металлов на функциональные свойства L-АСПаз экстремофильных микроорганизмов 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 [91].

Так, среди мезофильных гомологов в присутствии K^+ , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} фиксировали рост активности коммерческой EcA, причём при добавлении Mg^{2+} активность фермента достигала 330,6% [65]. В то же время, все двухвалентные ионы Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ингибировали активность EwA [92], а Mn^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} подавляли на 50-60% активность мутантных аналогов RrAI из *Rhodospirillum rubrum* [93].

Ионы Mn^{2+} повышали активность L-АСПаз *Fusarium culmorum* ASP-87 [94], *Mucor hiemalis* [95];

аналогичный эффект оказывали K^+ , Na^+ на EwA [92], L-АСПазы *Enterobacter cloacae* [96], *Pectobacterium carotovorum* [97].

Обнаружено, что термофильные ферменты, связывающие ионы металлов, характеризуются меньшим количеством внутренних пустот, гидрофильных участков на поверхности, имеют укороченные петли и меньшее число подверженных дезаминированию и окислению аминокислотных остатков [98].

Показано, что Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , связываясь с молекулой белка, играют важную роль в стабилизации структуры, предотвращая денатурацию при высоких температурах [99, 100].

Установлено, что ионы металлов могут изменять активность экстремофильных L-АСПаз, однако данные об их влиянии на термостабильность в настоящее время отсутствуют.

Ионы Mn^{2+} и Mg^{2+} (1 мМ) повышали активность L-АСПазы *T. zilligii* на 15-20%, другие ионы (Zn^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} и Cu^{2+}) не оказывали существенного влияния на активность фермента. Результаты были сопоставимы с данными, полученными для L-АСПазы *T. gammatolerans* EJ3, за исключением Zn^{2+} , который приводил к снижению её активности [48, 66]. В то же время, ионы Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} и Cu^{2+} не влияли на активность TkA [47]. Однако ионы Mg^{2+} в концентрациях 1 мМ и 10 мМ способствуют повышению активности TkA до 138% и 127% соответственно; Co^{2+} и Ni^{2+} (10 мМ) полностью ингибируют фермент; Ca^{2+} , Cu^{2+} и ЭДТА снижают активность до 80%, 15% и 90% соответственно [101].

Активность L-АСПазы термофильной археи *P. yayanosii* CH1 повышалась в присутствии ионов Mn^{2+} (190%) и снижалась при добавлении Ni^{2+} (78%) [49]. Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} оказывали незначительный эффект – менее 10%.

Ионы Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} (1 мМ) не оказывали влияния на активность бактериальной Л-АСПазы *T. thermophilus*, в то время как Zn^{2+} в концентрациях 0,5 мМ, либо 1 мМ снижал активность на 40% и 60% соответственно [59]. Аналогичные результаты были получены для Л-АСПазы *P. calidifontis* [56].

Примером металлозависимой Л-АСПазы является фермент галотолерантной бактерии *Staphylococcus* sp. OJ82 [65]. Среди восьми ионов металлов (K^+ , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}) лишь Co^{2+} , Fe^{2+} и Cu^{2+} значительно повышали активность до 263,9%, 203,7% и 109,3% соответственно. В то же время, ионы Mg^{2+} снижали активность Л-АСПазы до 25% [65]. ЭДТА (2 мМ) угнетал Л-АСПазную активность *Staphylococcus* sp. OJ82 (SoA) до 16% от исходного уровня, что указывает на металлозависимость фермента.

9. КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ГИДРОЛИЗА Л-АСПАРАГИНА ДЛЯ Л-АСПАРАГИНАЗ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Л-АСПазы экстремофилов характеризуются варьированием значений константы Михаэлиса (K_m), максимальной скорости реакции (V_{max}), каталитической константы (число оборотов, k_{cat}) и каталитической эффективности k_{cat}/K_m .

Для одной из наиболее изученных гипертермофильных Л-АСПаз – ТкА – кинетические характеристики приведены в работах [47, 101]. Согласно данным Chohan и соавт., [47], в реакционной смеси с Л-аспарагином значения K_m , V_{max} , k_{cat} , k_{cat}/K_m для ТкА составили соответственно 5,5 мМ, 3300 мМ \times мин $^{-1}\times$ мг $^{-1}$, 1397 с $^{-1}$, 254 мМ $^{-1}\times$ с $^{-1}$ (табл. 1). Другие авторы [101] приводят несколько отличные значения K_m , V_{max} , k_{cat} – 2,6 мМ, 1121 мМ \times мин $^{-1}\times$ мг $^{-1}$, 694 с $^{-1}$ соответственно (табл. 1).

Для Л-АСПазы термококка *T. gammatolerans* EJ3 в оптимальных условиях (85°C, pH 8,5) значения K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m составили соответственно 10,0 мМ, 5721 с $^{-1}$, 572,1 мМ $^{-1}\times$ с $^{-1}$ (табл. 1) [48]. При использовании в качестве субстрата Л-глутамин значения K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m составляли соответственно 39,5 мМ, 2048 с $^{-1}$, 51,9 мМ $^{-1}\times$ с $^{-1}$, что свидетельствовало о многократно сниженном сродстве к субстрату и каталитической эффективности реакции.

K_m для Л-АСПазы *T. zilligii* составила 6,08 мМ [66], что сопоставимо со значением для ТкА (5,5 мМ) [47], но ниже, чем для *T. aquaticus* T351 (8,6 мМ) [80] и *T. gammatolerans* EJ3 (10,0 мМ) [48] (табл. 1).

Величина k_{cat}/K_m для Л-АСПазы *T. zilligii* (537,3 мМ $^{-1}\times$ с $^{-1}$) достаточно близка к таковой для фермента *T. gammatolerans* EJ3 (572,1 мМ $^{-1}\times$ с $^{-1}$), но выше, чем для ТкА (254 мМ $^{-1}\times$ с $^{-1}$) и PfA (72,5 мМ $^{-1}\times$ с $^{-1}$) (табл. 1).

Значительные различия выявлены в кинетических показателях Л-АСПаз пироккокков. Так, для Л-аспарагиназы *P. yayanosii* CH1 величины K_m , V_{max} были сопоставимы с таковыми для термококков *T. zilligii* [66],

T. kodakaraensis KOD1 [47] – 6,5 мМ и 2929 мМ/мин соответственно [49]. Фермент PfA имел одно из самых высоких значений K_m (12,1 \pm 0,05 мМ), при k_{cat} , k_{cat}/K_m равных соответственно 888,6 \pm 54,4 с $^{-1}$, 72,5 мМ $^{-1}\times$ с $^{-1}$ [50]. В физиологических условиях (37°C, pH 7,4) значения кинетических констант K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m для PfA составили соответственно 8,12 \pm 0,3 мМ, 17,98 \pm 0,6 с $^{-1}$, 2,21 \pm 0,01 мМ $^{-1}\times$ с $^{-1}$ [50]. Таким образом, несмотря на снижение величины K_m , каталитическая эффективность фермента при физиологических условиях на основании показателя k_{cat}/K_m была минимальна.

Одно из самых низких значений K_m среди экстремофильных Л-АСПаз получено для ферментов архей *A. fulgidus*: 5 \times 10 $^{-6}$ М и 8 \times 10 $^{-5}$ М при 70°C и 37°C соответственно, причём при повышенных температурах сродство фермента к субстрату увеличивается. В физиологических же условиях K_m для Л-АСПазы *A. fulgidus* выше, чем у EcA – 1,2 \times 10 $^{-5}$ М [69].

Бактериальные экстремофильные Л-АСПазы характеризуются более высоким сродством к Л-аспарагину в сравнении с гомологами архейного происхождения; тем не менее, их величины K_m превышают значения, полученные для мезофильных Л-АСПаз. Так, K_m , V_{max} для фермента *S. thermoluteus* subsp. fuscus NBRC 14270 составили 1,83 \pm 0,22 мМ, 92,73 \pm 4,30 мМ \times мин $^{-1}\times$ мг $^{-1}$, а для EcA – 0,34 \pm 0,06 мМ, 44,59 \pm 2,27 мМ \times мин $^{-1}\times$ мг $^{-1}$ соответственно. Таким образом, значение K_m для АСПазы NBRC 14270 в 5,4 раза превышает K_m для EcA [58].

Для Л-АСПазы термофильной бактерии *T. thermophilus*, галотолерантной *Bacillus* sp. SL-1, значения K_m составили соответственно 2,8 мМ [59], 10,30 мМ [62], что выше, чем для Л-АСПазы *E. coli* K-12 – 5,788 мМ [62]. Отмечается, что сродство к Л-аспарагину у фермента *Bacillus* sp. SL-1 существенно выше чем у Л-АСПаз близкородственных штаммов *B. subtilis* B11-06 и *B. licheniformis* MTCC 429 [62]. Значения k_{cat} , k_{cat}/K_m для Л-АСПазы *Bacillus* sp. SL-1 составили соответственно 23,96 с $^{-1}$, 2326 мМ $^{-1}\times$ с $^{-1}$ [62].

Значения кинетических показателей Л-АСПазы *B. subtilis* 168 при 30°C (оптимум температуры – 65°C) составили: K_m = 2,06 мМ, k_{cat} = 98,6 с $^{-1}$, k_{cat}/K_m = 480 мМ $^{-1}\times$ с $^{-1}$. В данных условиях значение каталитической константы фермента было сопоставимо с величиной этого показателя для EcA, но ниже, чем для EwA [61]. Л-АСПазы *B. subtilis* 168 имела более низкое сродство к субстрату по сравнению с EcA и EwA.

Л-АСПазы галотолерантной бактерии *Staphylococcus* sp. OJ82 сопоставима с Л-АСПазой *B. subtilis* 168 по значению K_m – 2,2 мМ; при этом фермент характеризовался сниженной более чем в 20 раз в сравнении с ней каталитической константой – 4,65 с $^{-1}$ [65].

Совокупность экспериментальных данных, полученных для экстремофилов, свидетельствует о том, что значения K_m для Л-АСПаз архей существенно превышают таковые для бактериальных штаммов. В сравнении с Л-АСПазами мезофильных

микроорганизмов большинство как термофильных, так и галотолерантных гомологов характеризуются сниженным сродством к субстрату (табл. 1).

Относительно высокие значения K_m для термофильных ферментов в сравнении с мезофильными гомологами характерны и для других ферментов: фосфоглицераткиназы [102], глутаматдегидрогеназы [103], щелочной фосфатазы [104, 105], ГТРАЗы (TmE) [106].

У экстремофильных L-АСПаз наряду с повышенными значениями K_m , как правило, увеличена каталитическая константа k_{cat} (табл. 1). Повышение k_{cat} , либо каталитической эффективности k_{cat}/K_m может обеспечиваться снижением энергии активации при увеличении конформационной подвижности в области активного центра, которая, в свою очередь, приводит к снижению сродства к субстрату и повышению K_m .

Таким образом, увеличение значений k_{cat} и K_m для термофильных L-АСПаз может рассматриваться как адаптивная особенность, позволяющая оптимизировать каталитическую активность путём достижения баланса между процессом связывания субстрата и скоростью высвобождения продукта. При этом L-аспарагиназная активность у многих термофильных L-АСПаз выше, чем у мезофильных гомологов (табл. 1), что позволяет надеяться на успешное использование экстремофильных АСПаз в биомедицине.

10. АКТИВНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ L-АСПАРАГИНАЗ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

10.1. Влияние температуры

Большинство изученных к настоящему времени L-АСПаз экстремофилов являются термофильными/гипертермофильными и сохраняют высокую активность в широком диапазоне повышенных температур.

По данным Hong и соавт. L-АСПаза TkA при оптимуме 90°C стабильна в интервале температур 70-90°C в течение 32-часовой инкубации [101]. При 85°C и 14 мин в кипящей воде [47] период полужизни TkA составляет 130 мин. L-АСПаза *T. gammatolerans* с температурой оптимума 85°C сохраняет более 75% активности при 70-95°C. При 2-х часовой инкубации при 70°C, 80°C, 85°C, 90°C и 95°C сохраняется 66%, 60%, 54%, 53% и 43% активности соответственно [48].

Таблица 2. Структурные особенности L-АСПаз термофильных и мезофильных микроорганизмов (адаптировано из [52])

Структурные особенности	Термофильные L-аспарагиназы			Мезофильные L-аспарагиназы		
	TkA	PhA	PfA	EcA I	<i>Yersinia pestis</i>	L-АСП I <i>Vibrio cholerae</i>
Солевые мостики, %	20,0	17,5	19	13,9	9,2	9,9
Водородные связи, %	73	72	73	71	73	73
Содержание спиралей, %	29	30	28	29	29	28
Содержание аминокислотных остатков, %						
Pro	5,5	4,0	4,0	6,5	5,3	6,2
Arg	7,0	4,6	4,6	4,4	4,1	3,0
Tyr	3,0	3,7	3,4	4,1	3,3	3,9
Cys	0,0	0,0	0,6	0,3	0,3	0,6
Ser	4,3	6,7	4,9	4,7	7,4	5,9

По термостабильности L-АСПаза *T. zilligii* занимает промежуточное положение: она более стабильна, чем TkA [47], но менее стабильна, чем L-АСПаза *T. gammatolerans* EJ3 [48].

Активность L-АСПазы *T. zilligii* также повышается с ростом температуры от 40°C до 90°C, более 70% активности определяется в интервале 70-95°C [66]. При 70-85°C и двухчасовой инкубации отмечается лишь незначительное её снижение.

L-АСПаза *P. uyanosii* CH1 обладает высокой термостабильностью в широком интервале температур (70-95°C и 20-37°C) [49]. Максимальная активность фермента была зафиксирована при 95°C, что превышает значения, полученные для описанных выше L-АСПаз термококков.

Наиболее термостабильная L-АСПаза описана в работе Chohan и соавт. [56], где было показано, что активность L-АСПазы *P. calidifontis* увеличивается с ростом температуры до 100°C, причём период полужизни фермента в кипящей воде составляет 150 мин, что превышает все полученные ранее значения для гипертермофильных L-АСПаз микроорганизмов.

Многие ферменты галофильных микроорганизмов обладают повышенной стабильностью при длительном хранении в условиях умеренных температур [107]. Среди L-АСПаз таким примером является L-АСПаза *Bacillus* sp. SL-1, которая характеризуется высокой стабильностью в широком диапазоне температур – от -20°C до +50°C [62]. При -20°C активность L-АСПазы *Bacillus* sp. SL-1 не снижалась в течение года.

10.2. Структурные особенности термостабильных L-аспарагиназ

В качестве факторов, определяющих термостабильность белков, могут выступать: повышенная гидрофобность, большое количество водородных связей и солевых мостиков, повышенное содержание спиралей, низкое содержание а.о. Cys и Ser, высокое содержание а.о. Arg, Tyr, Pro, более плотная упаковка, уменьшение размера и количества полостей [70].

При сравнении по ряду данных показателей термофильных и мезофильных L-АСПаз было показано, что ферменты архей TkA, PhA, PfA характеризуются повышенным содержанием солевых мостиков (табл. 2) [70]. Дополнительно TkA отличался сниженным содержанием Cys и Ser и увеличенным Arg (табл. 2) [70].

Анализ аминокислотной последовательности L-АСПазы археи *P. calidifontis* выявил высокое процентное содержание а.о. гидрофобных аминокислот Val, Leu, Ile (~22%) и сниженное содержание Gln (1,7%), Asp (1,7%), Cys (0%) [56]. Биоинформатический анализ последовательности L-АСПазы *P. calidifontis* показал, что 109 из 299 а.о. находятся в α -спиральной конформации, чему способствует высокое содержание в белке Ala (выше 15%). Высокое содержание α -спиралей (свыше 42%) является также структурной особенностью термофильной L-АСПазы *P. yayanosii* CH1 [49]. На примере этого фермента показано, что стабилизация структуры белка посредством усиления взаимодействия между а.о. способствует повышению его термостабильности.

Дополнительные связи, образуемые между Ser90 и Leu86, Gly149, Ser91, Ala87 в результате точечной мутации Ala90Ser, увеличили период полужизни L-АСПазы *P. yayanosii* CH1 со 105 мин до 150 мин при 85°C (рис. 7) [51].

Термофильные ферменты характеризуются более плотной и жёсткой структурой в сравнении с мезофильными и психрофильными гомологами, что позволяет им сохранять каталитическую активность, несмотря на высокие температуры. Важную роль в стабилизации их структуры играют дополнительные ионные, водородные, дисульфидные связи, гидрофобные взаимодействия.

Водородные связи и солевые мостики могут увеличивать плотность упаковки термофильного белка при комнатных температурах и при этом обеспечивать достаточную для выполнения функции подвижность в условиях повышенных температур [108].

В частности, важную роль играет формирование стабильной сложной системы солевых мостиков, в создании которой часто принимают участие остатки Arg [109,110]. Подтверждением данного заключения может служить L-АСПаза термофильной археи *T. kodakaraensis* KOD1.

Таким образом, повышенная термоактивность и термостабильность экстремофильных L-АСПаз является результатом целого ряда структурных адаптаций.

10.3. Влияние pH

Результаты исследования экстремофильных L-АСПаз показывают, что высокая каталитическая активность этих ферментов наблюдается в диапазоне pH 7,0-9,0, что сопоставимо с оптимальными условиями для многих мезофильных L-АСПаз (оптимум pH 8,0-9,0): *E. coli*, *E. chrysanthemi*, *Pseudomonas stutzeri*, *E. carotovora* [74, 111], *Yersinia pseudotuberculosis* [112].

К числу L-АСПаз, проявляющих максимальную активность при более щелочной реакции среды (pH 9,2), относятся ферменты *T. thermophilus* [59] и *A. fulgidus* [55], при более низких значениях pH – L-АСПаза *P. calidifontis* (оптимум pH при 6,5) [56].

Термофильные L-АСПазы сохраняют высокую активность в широком диапазоне pH: *T. kodakaraensis* KOD1 – до 40% активности при pH 7,0-11,0 [47], 20-100% – при pH 5,0-10,5 [101]; *T. zilligii* – 80% активности в интервале pH 6,5-10,0 [66]; *T. gammatolerans* – 85% активности при pH 8,0-10,0 [48].

L-АСПаза *P. yayanosii* CH1 при оптимуме pH 8,0, сохраняла высокую активность в диапазоне pH 7,0-10,0 [49]. В кислых условиях среды наблюдалось снижение активности фермента – до 57% при pH 6,0. Максимальная активность L-АСПазы галотолерантной бактерии *Bacillus* sp. SL-1 сохранялась в течение суток в интервале значений pH 4,5-10,0 [62].

Таким образом, более высокая активность L-АСПаз как мезофильных, так и экстремофильных микроорганизмов наблюдается в нейтральной либо слабощелочной среде, при этом экстремофильные гомологи стабильны в широком диапазоне pH.

10.4. Стабильность в присутствии солей

Ферменты галофильных/галотолерантных микроорганизмов сохраняют высокую стабильность в присутствии солей, в связи с чем представляют большой практический интерес.

Описаны свойства галотолерантных L-АСПаз *B. subtilis* 168, *Staphylococcus* sp. OJ82, выделенных из соляных озёр, *Bacillus* sp. SL-1, *Bacillus* sp. BCCS 034, *Bacillus aryabhattai* [61-65]. Как и другие галотолерантные белки, данные L-АСПазы высоко

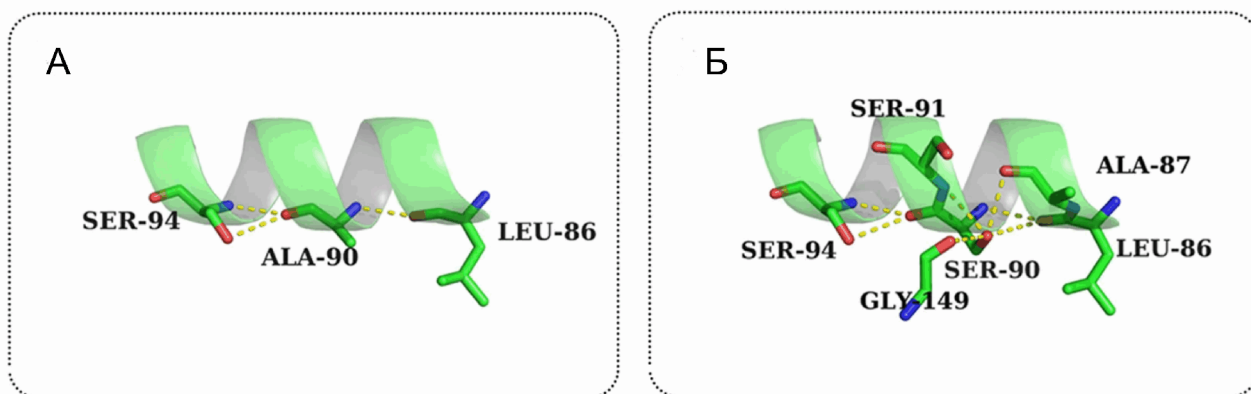


Рисунок 7. Структура L-АСПазы *P. furiosus* (PfA), где N-PfA – N-концевой домен, C-PfA – C-концевой домен, объединённые междоменным линкером (обозначен жёлтым цветом), А – субъединица I, Б – субъединица II [51]. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии журнала.

стабильны в присутствии NaCl. Активность L-АСПазы SoA в реакционной смеси, содержащей 2 М NaCl, составляла 61,2% от максимальной, в то время как активность ЕсА снижалась до 48% [65].

Интересно, что АСПза SoA, стабильная в присутствии хлорида натрия, является металлозависимой L-АСПазой. Основным кофактором фермента, повышающим его активность до 263%, служат ионы Co^{2+} [65]. Тем не менее, при оптимальных условиях (рН 9,0, 37°C) добавление Co^{2+} более чем в 2 раза снижало стабильность SoA к NaCl. Согласно выводам авторов, солевой стресс оказывает влияние на характер конформационных изменений при связывании кофактора с ферментом. Образующий в структуре комплекса Co-L-АСПазы солевой мостик в присутствии NaCl препятствует связыванию субстрата, по-видимому, приводя к снижению подвижности петли, которая играет ключевую роль в обеспечении доступности активного центра для субстрата [65].

Таким образом, L-АСПазы галотолерантных/галофильных микроорганизмов обладают повышенной стабильностью при высоких концентрациях солей, что создаёт дополнительные возможности для их применения в технологиях пищевых производств. Однако при солевом стрессе в присутствии кофактора активность данных L-АСПаз может снижаться, что указывает на важную роль ионных взаимодействий в обеспечении каталитической активности фермента.

10.5. Стабильность в денатурирующих условиях

Некоторые L-АСПазы характеризуются значительной структурной устойчивостью в денатурирующих условиях, которая может показаться удивительной для фермента с нековалентно связанными субъединицами. Примером является EwA, после 48-часовой инкубации которой в 0,2 М фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 8 М мочевины, диссоциируют только 50% молекул [113]. В исследовании L-АСПазы TkA также была показана устойчивость фермента в денатурирующих условиях: при концентрациях мочевины 1-6 М не было отмечено значительного снижения активности фермента [47]. В присутствии 8 М мочевины снижение активности составило 30%, что свидетельствовало о частичной диссоциации молекул.

В отличие от не обладающей зарядом мочевины, гуанидин хлорид в концентрации 1 М частично, а 4 М полностью инактивировал TkA [47]. Сходные результаты были получены для PfA [52]. В то же время, 8 М мочевина не приводила к структурным изменениям и снижению активности фермента [52].

Установлено, что мочевина не приводит к денатурации L-АСПазы и её инактивации, однако в присутствии гуанидин хлорида наблюдается двухступенчатый профиль денатурации. Снижение активности фермента при низких концентрациях гуанидин хлорида (1 М) и изменение его спектра КД в ближнем УФ-свете свидетельствует об изменениях третичной структуры его активного центра [52].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известные недостатки коммерческих препаратов терапевтических L-АСПаз [12, 40-44] определяют интерес к разработке новых аналогов этих ферментов с улучшенными характеристиками. Более активные и стабильные, менее токсичные и иммуногенные варианты L-АСПаз были получены в последние десятилетия методами белковой химии и инженерии, компьютерного дизайна, наноинкапсулирования, иммобилизации и др. [2].

Свой вклад в разработку таких улучшенных фармпрепаратов L-АСПаз вносит структурно-функциональное исследование этих ферментов у термофилов, являющихся естественным источником высокостабильных ферментов с широкими перспективами применения в различных биотехнологиях. Отличительной особенностью ферментов термофильных организмов является устойчивость к различным факторам внешней среды, прежде всего, повышенной и пониженной температуре, высокой солености, кислым и щелочным значениям рН. В связи с этим экстремофильные микроорганизмы представляют один из наиболее перспективных источников L-АСПаз с характеристиками, расширяющими возможности их использования в биотерапии, пищевой промышленности и диагностике.

В таблице 3 суммированы некоторые важные для биомедицинских приложений параметры экстремофильных и мезофильных L-АСПаз, применяемых в клинической практике. Как уже отмечалось выше, высокая удельная активность архейных L-АСПаз при высоких температурах сочетается с относительно низкой каталитической эффективностью, которая резко снижается при физиологической температуре. Несмотря на это, архейные L-АСПазы и их “мезофильные аналоги” проявляют высокую специфическую антилейкемическую активность *in vitro*, что может определяться такими свойствами, как высокая стабильность, устойчивость к денатурации и протеолизу.

Можно выделить два направления, где изучение термофильных L-АСПаз помогает в разработке новых производных этих ферментов.

Первое направление – получение “мезофильных” аналогов термофильных L-АСПаз, обладающих высокой активностью при физиологических значениях температуры. Действительно, архейные термофильные L-АСПазы в оптимальных условиях определения обладают высокой удельной активностью и стабильностью, однако их применение в клинике ограничено низкой активностью при физиологических значениях температуры (табл. 3). Для повышения субстратной специфичности и активности при физиологических условиях L-АСПазы *P. furiosus* было получено 3 мутантных аналога фермента Thr53Gln, Lys274Glu и Thr53Gln, не обладавших L-глютаминазной активностью [50]. В опытах *in vitro* все мутанты имели более сильную цитотоксическую активность в отношении чувствительных к L-АСПазе

L-АСПАРАГИНАЗЫ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В БИМЕДИЦИНЕ

Таблица 3. Некоторые важные для биомедицины характеристики мезофильных терапевтических АСПаз и АСПаз экстремофилов

	Название АСПазы	Актив-ность уд. (МЕ/мг белка)	K_m (мМ) ¹	k_{cat} (сек ⁻¹) ¹	Оптимум темп., °С	Четвер-тичная структура	Устой-чивость к трипсину	$T_{1/2}$ (мин) ²	Цитотокси-ческая активность ³	L-глутами-назная активность ⁴ (%)	Оптимум pH	Ссылки
АРХ - ЭКСТРЕМО	KOD1	2350	2,6	~700	85	Димер	+++	130	0,05 Ед./мл	Нет	6,0-10,0	[47, 119]
	PfA K274E	500	~4 ~2	~25 ~200	90	Димер	+++	–	0,001 Ед./мл	Нет	7,4-8,2	[50, 52, 114]
	PfA мутант W1	1500	~8 ~12	~18 ~900	90	Димер	+++	105 [120]	0,001 Ед./мл	Нет	7,4-8,2	[50, 52, 114]
ТЕРАПЕВ-МЕЗО	EwA	430	0,1	210	37	Тетрамер	+	<7,5 [120]	1 Ед./мл	~10	7,0-10,0	[4, 7, 8, 84, 120]
	EcA	235	0,015	45	37	Тетрамер	+	60 [120]	0,1 Ед./мл [50]	~3	8,0-8,6	[4, 7, 8, 84, 120]

Примечание. 1 – Для WT и K274E мутантов АСПазы *P. furiosus* жирным выделены значения кинетических констант при оптимальной температуре, обычным шрифтом – при 37°C. 2 – Время полуинактивации: при 85°C для экстремофильных АСПаз при 50°C для мезофильных терапевтических АСПаз. 3 – Концентрация фермента необходимая для 50%-ного подавления роста клеток линии HL-60 *in vitro*. 4 – Активность при 37°C (при 85°C L-глутамин нестабилен).

клеточных линий человека HL60, MCF7 и K562. Мутанты Thr53Gln и Lys274Glu в очень низких концентрациях (0,001 МЕ/мл) оказывали мощное цитотоксическое действие на клетки линии HL60. Для достижения аналогичного эффекта требовались в 10 раз большие концентрации PfA из дикого штамма и примерно в 1000 раз более высокие дозы коммерческой аспарагиназы EcA из *E. coli* [50].

При дизайне аналогов методами компьютерного моделирования авторы идентифицировали а.о., влияющие на жесткость “крышки” активного сайта PfA при физиологической температуре [50]. Замены K274E и T53Q устранили солевые мостики, блокирующие доступность активного сайта при 37°C. Полученные мутанты обладали улучшенными кинетическими параметрами по сравнению с ферментом “дикого типа” – K_m была снижена в 2 раза, удельная активность повышена в 2,5 раза при 37°C. По этим свойствам рекомбинантные аналоги были близки к мезофильным ферментам. Все аналоги сохраняли высокую термостабильность и устойчивость к трипсинолизу, а L-глутаминовая активность полностью отсутствовала, что важно для нивелирования побочных эффектов фермента.

Другое направление состоит в получении термостабильных аналогов мезофильных L-АСПаз.

В недавней работе методами компьютерного моделирования и сайт-направленного мутагенеза аспарагиназ PYA (*P. yamashii*), EcA (*E. coli*), TGA (*Thermococcus*) и BSAII (*B. subtilis*) были выявлены важные для термостабильности этих ферментов элементы вторичной структуры и отдельные а.о. [114]. Так было показано, что замены остатков D51, и K298, делеции С-концевой альфа

спирали PYA резко снижают термостабильность. Сопоставление пространственных структур позволило идентифицировать гомологичные а.о. в составе аспарагиназ *E. coli*, *B. subtilis*, *Thermococcus*.

Полученные данные были использованы для дизайна более термостабильных аналогов терапевтической аспарагиназы EcA. Сконструированные аналоги EcA-G57D и EcA-L305K, проявляли значительно более высокую стабильность при 500°C и 370°C, более высокую удельную активность, по сравнению с ферментом дикого типа.

Таким образом, подобные исследования позволяют получить новые варианты аспарагиназ с весьма привлекательными противолейкемическими характеристиками и вносят вклад в понимание структурных основ активности и термостабильности этих ферментов.

Особенностью многих экстремофильных L-АСПаз является активность в димерной форме в отличие от тетрамерных мезофильных гомологов. Таким образом, экстремофильные L-АСПазы имеют сниженную молекулярную массу, что уменьшает риск аллергических проявлений и создаёт дополнительные перспективы для их применения в онкогематологии.

Следует сказать, что L-АСПазы экстремофилов существенно различаются по своим биохимическим, физическим, структурным, функциональным и кинетическим характеристикам, что обуславливает огромный научный интерес к ним как к источнику новых данных о структурно-функциональном разнообразии, вариативности физико-химических и энзиматических свойств данных ферментов. Резюмируя сказанное, важно отметить перспективность конструирования методами

генетической инженерии и получения АСПаз экстремофильных микроорганизмов с оптимальными для терапевтического применения параметрами, что касается оптимумов pH и температуры, минимизации L-глутаминазной активности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант №19-08-01112 А) (литературные источники по L-АСПАзам экстремофилов) и Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы (результаты собственных исследований L-АСПаз мезофильных микроорганизмов).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Solomon B., Parihar N., Ayodele L., Hughes M. (2017) J. Blood Disord. Transfus., **8**, 24.
- Brumano L.P., da Silva F.V.S., Costa-Silva T.A., Apolinario A.C., Santos J.H.P.M., Kleingesinds E.K., Monteiro G., Rangel-Yagui C.O., Benyahia B., Junior A.P. (2018) Bioeng. Biotechnol., **6**, 1-22.
- Avramis V.I., Tiwari P.N. (2006) Int. J. Nanomedicine, **1**(3), 241-254.
- Verma N., Kumar K., Kaur G., Anand S. (2007) Crit. Rev. Biotechnol., **27**(1), 45-62.
- Kumar K., Kaur J., Walia S., Pathak T., Aggarwal D. (2014) Leuk. Lymphoma, **55**(2), 256-262.
- Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Каралкин П.А., Кондакова Л.И., Соколов Н.Н. (2013) Биомедицинская химия, **59**(5), 498-513. [Abakumova O.Yu., Podobed O.V., Karalkin P.A., Kondakova L.I., Sokolov N.N. (2013) Biomeditsinskaya Khimiya, **59**(5), 498-513.]
- 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) Биомедицинская химия, **61**(3), 312-324. [Sokolov N.N., Eldarov M.A., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Abakumova O.Yu., Podobed O.V., Melik-Nubarov N.S., Kudryashova E.V., Grishin D.V., Archakov A.I. (2015) Biomeditsinskaya Khimiya, **61**(3), 312-324.]
- Avramis V.I. (2014) Blood, **123**(23), 3532-3533.
- Matsumoto Y., Nomura K., Kanda-Akano Y., Fujita Y., Nakao M., Ueda K., Horiike S., Yokota S., Kusuzaki K., Kitoh T., Watanabe A., Taniwaki M. (2003) Leuk. Lymphoma, **44**(5), 879-882.
- Müller H.J., Boos J. (1998) Crit. Rev. Oncol. Hematol., **28**(2), 97-113.
- Hill J.M., Roberts J., Loeb E., Khan A., Maclellan A., Hill R.W. (1967) JAMA J. Am. Med. Assoc., **202**(9), 82-88.
- Duval M., Suciu S., Ferster A., Rialland X., Nelken B., Lutz P., Benoit Y., Robert A., Manel A.M., Vilmer E., Otten J., Philippe N. (2002) Blood, **99**, 2734-2739.
- Wrobel G., Dobaczewski G., Kazanowska B., Bogusławska-Jaworska J., Balwier W., Balcerska A., Bubala H., Dłuzniewska A., Koleczek P., Kowalczyk J., Kurylak A., Maciejka-Kapuscinska L., Matysiak M., Rokicka-Milewska R., Sońta-Jakimczyk D., Sopyło B., Stefaniak M.J., Stefańska K., Stańczak E., Wysocki M. (2000) Med. Wieku. Rozw., **4**, 67-72.
- Kobrin N.L., Spoto R., Shah N.R., Anderson J.R., DeLaat C., Morse M., Warkentin P., Gilchrist G.S., Cohen M.D., Shina D., Meadows A.T. (2001) J. Clin. Oncol., **9**(9), 2390-2396.
- Agrawal N.R., Bukowski R.M., Rybicki L.A., Kurtzberg J., Cohen L.J., Hussein M.A. (2003) Cancer, **98**(1), 94-99.
- Miller A.J., Palmer A.S., Eliska O., Eliskova M., DeBoer A., Greene R. (1996) Lymphology, **29**, 158-165.
- Cedar H., Schwartz J.H. (1967) J. Biol. Chem., **242**(16), 3753-3755.
- Ho P.P., Milikin E.B., Bobbitt J.L., Grinnan E.L., Burck P.J., Frank B.H., Boeck L.D., Squires R.W. (1970) J. Biol. Chem., **245**(14), 3708-3715.
- Sanches M., Krauchenco S., Polikarpov I. (2012) Curr. Chem. Biol., **1**(1), 75-86.
- Nguyen H.A., Su Y., Lavie A. (2016) Biochemistry, **55**(8), 246-253.
- Lazarus H., McCoy T.A., Farber S., Barell E.F., Foley G.E. (1969) Exp. Cell Res., **57**(1), 134-138.
- Horowitz B., Madras B.K., Meister A., Old L.J., Boyse E.A., Stockert E. (1968) Science, **160**(3827), 533-535.
- Story M.D., Voehringer D.W., Stephens L.C., Meyn R.E. (1993) Cancer Chemother. Pharmacol., **32**(2), 129-133.
- Ueno T., Ohtawa K., Mitsui K., Kodera Y., Hiroto M., Matsushima A., Inada Y., Nishimura H. (1997) Leukemia, **11**(11), 1858-1861.
- Ravi A., Gurunathan B. (2018) Food Technol. Biotechnol., **56**(1), 51-57.
- Baskar G., Subanjalin Joy S., Aiswarya R. (2016) Int. J. Mod. Sci. Technol., **609**(10), 224-229.
- Aiswarya R., Baskar G. (2018) Int. J. Food Sci. Technol., **53**, 491-498.
- Torang A., Alemzadesh I. (2016) Int. J. Eng., **29**(7), 879-886.
- Baskar G., Aiswarya R. (2018) J. Sci. Food Agric., **98**(12), 4385-4394.
- Keramat J., LeBail A., Prost C., Jafari M. (2011) Food Bioprocess Technol., **4**(4), 530-543.
- Gurunathan B., Sahadevan R. (2011) Int. J. Chem. React. Eng., **7**, 1542-1580.
- Abboudi M., Al-Bachir M., Koudsi Y., Jouhara H. (2016) Int. J. Food Prop., **19**(7), 1447-1454.
- Sharma D., Singh K., Singh K., Mishra A. (2019) Curr. Protein Pept. Sci., **20**(5), 452-464.
- Verma N., Bansal M., Kumar S. (2012) Adv. Appl. Sci. Res., **3**(2), 809-814.
- Verma N., Kumar K., Kaur G., Anand S. (2007) Artif. Cells Blood Substitutes, Biotechnol., **35**(4), 449-456.
- Hurst P.L., Boulton G., Lill R.E. (1998) Food Chem., **61**(3), 381-384.
- Izco J.M., Torre P., Barcina Y. (2000) Food Control., **11**(1), 7-11.
- Sharma S.K., Sehgal N., Kumar A. (2003) Curr. Appl. Phys., **3**(2-3), 307-316.
- Kumar K., Kataria M., Verma N. (2013) Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol., **41**(3), 184-188.

40. El-Naggar N.E.A., El-Ewasy S.M., El-Shweihy N.M. (2014) *Int. J. Pharmacol.*, **10**(4), 182-199.
41. Wang B., Relling M.V., Storm M.C., Woo M.H., Ribeiro R., Pui C.H., Hak L. (2003) *J. Leukemia*, **7**(8), 1583-1588.
42. Plourde P.V., Jeha S., Hijiya N., Keller F.G., Silverman L.B., Rheingold S.R., Dreyer Z.E., Dahl G.V., Mercedes T., Lai C., Corn T. (2014) *Pediatr. Blood Cancer*, **61**(7), 1232-1238.
43. Hijiya N., van der Sluis I.M., (2016) *Leuk. Lymphoma*, **57**(4), 748-757.
44. Grace R.F., Dahlberg S.E., Neuberg D., Sallan S.E., Connors J.M., Neufeld E.J., DeAngelo D.J., Silverman L.B. (2011) *Br. J. Haematol.*, **152**(4), 452-459.
45. Storti E., Quaglini D. (1970) *Recent Results Cancer Res.*, **33**, 344-349.
46. Guo J., Coker A.R., Wood S.P., Cooper J.B., Chohan S.M., Rashid N., Akhtar M. (2017) *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.*, **73**(11), 889-895.
47. Chohan S.M., Rashid N. (2013) *J. Biosci. Bioeng.*, **116**(4), 438-443.
48. Zuo S., Xue D., Zhang T., Jiang B., Mu W. (2014) *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **109**, 122-129.
49. Li X., Zhang X., Xu S., Zhang H.H., Xu M., Yang T., Wang L., Qian H., Zhang H., Fang H., Osire T., Rao Z., Yang S. (2018) *Sci. Rep.*, **8**(1), 7915.
50. Bansal S., Srivastava A., Mukherjee G., Pandey R., Verma A.K., Mishra P., Kundu B. (2012) *FASEB J.*, **26**(3), 1161-1171.
51. Garg D.K., Kundu B. (2017) *Arch. Biochem. Biophys.*, **622**, 36-46.
52. Bansal S., Gnaneswari D., Mishra P., Kundu B. (2010) *Biochemistry (Moscow)*, **75**(3), 375-381.
53. Garg D.K., Tomar R., Dhoke R.R., Srivastava A., Kundu B. (2015) *Extremophiles*, **19**(3), 681-691.
54. Yao M., Yasutake Y., Morita H., Tanaka I. (2005) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **61**(Pt 3), 294-301.
55. Li J., Wang J., Bachas L.G. (2002) *Anal. Chem.*, **74**(14), 3336-3341.
56. Chohan S.M., Rashid N., Sajed M., Imanaka T. (2019) *Folia Microbiol. (Praha)*, **64**(3), 313-320.
57. Fiala G., Stetter K.O. (1986) *Arch. Microbiol.*, **145**(1), 56-61.
58. Hatanaka T., Usuki H., Arima J., Uesugi Y., Yamamoto Y., Kumagai Y., Yamasato A., Mukaiharu T. (2011) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **163**(7), 836-844.
59. Pritsa A.A., Kyriakidis D.A. (2001) *Mol. Cell. Biochem.*, **216**(1-2), 93-101.
60. Tiwari A.K., Rao J.V., Doriya K., Kumar D.S., Qureshi A., Ashok A. (2019) *Sci. Rep.*, **9**(11), 423.
61. Onishi Y., Yano S., Thongsanit J., Takagi K., Yoshimune K., Wakayama M. (2011) *Ann. Microbiol.*, **61**(3), 517-524.
62. Safary A., Moniri R., Hamzeh-Mivehroud M., Dastmalchi S. (2019) *BioImpacts*, **9**(1), 15-23.
63. Shirazian P., Asad S., Amoozegar M.A. (2016) *EXCLI J.*, **15**, 268-279.
64. Ebrahiminezhad A., Rasoul-Amini S., Ghasemi Y. (2011) *Indian J. Microbiol.*, **51**(3), 307-311.
65. Han S., Jung J., Park W. (2014) *J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**(8), 1096-1104.
66. Zuo S., Zhang T., Jiang B., Mu W. (2015) *Extremophiles*, **19**(4), 841-851.
67. Kotzia G.A., Labrou N.E. (2007) *J. Biotechnol.*, **127**(4), 657-669.
68. Angelica M.E., Evangelista-Martinez Z., Gonzalez-Mondragyn E.G., Calderon-Flores A., Arreguin R., Perez-Rueda E., Huerta-Saquero A. (2012) *J. Microbiol. Biotechnol.*, **22**(3), 292-300.
69. Swain A.L., Jaskólski M., Housset D., Rao J.K., Wlodawer A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**(4), 1474-1478.
70. Guo J., Coker A.R., Wood S.P., Cooper J.B., Chohan S.M., Rashid N., Akhtar M. (2017) *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.*, **73**(Pt11), 889-895.
71. Michalska K., Jaskolski M. (2006) *Acta Biochim. Pol.*, **53**(4), 627-640.
72. Khushoo A., Pal Y., Singh B.N., Mukherjee K.J. (2004) *Protein Expr. Purif.*, **38**(1), 29-36.
73. Pourhossein M., Korbekandi H. (2014) *Adv. Biomed. Res.*, **119**(4), 309-323.
74. Соколов Н.Н., Эльдаров М.А., Сидорук К.В., Жгун А.А., Борисова А.А., Александрова С.С., Омельянюк Н.М., Бозуш В.Г., Красоткина Ю.В., Гervaziev Ю.В., Покровская М.В., Соков Б.Н., Березов Т.Т., Скрибин К.Г., Арчаков А.И. (2005) *Молекулярная медицина*, **3**(1), 45-52. [Sokolov N.N., Eldarov M.A., Sidoruk K.V., Zhgun A.A., Borisova A.A., Alexandrova S.S., Omelianyuk N.M., Bogush V.G., Krasotkina Yu.V., Gervaziev Yu.V., Pokrovskaya M.V., Sokov B.N., Berezov T.T., Scriabin K.G., Archakov A.I. (2005) *Molekularnaya meditsina*, **3**(1), 45-52.]
75. Cappelletti D., Chiarelli L.R., Pasquetto M.V., Stivala S., Valentini G., Scotti C. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **377**(4), 1222-1226.
76. Kumar S., Veeranki V.D., Pakshirajan K. (2011) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **163**(3), 327-337.
77. Aung H.P., Bocola M., Schleper S., Röhm K.H. (2000) *Biochim. Biophys. Acta, - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, **1481**(2), 349-359.
78. Kozak M., Borek D., Janowski R., Jaskólski M. (2002) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **58**(1), 130-132.
79. Aghaiypour K., Wlodawer A., Lubkowski J. (2001) *Biochemistry*, **40**(19), 5655-5664.
80. Curran M.P., Daniel R.M., Guy G.R., Morgan H.W. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.*, **241**(2), 571-576.
81. Goodsell D.S. (2005) *Oncologist*, **10**, 238-249.
82. Charbonneau D.M., Aubé A., Rachel N.M., Guerrero V., Delorme K., Breault-Turcot J., Masson J.F., Pelletier J.N. (2017) *ACS Omega*, **2**(5), 2114-2125.
83. Ollenschläger G., Roth E., Linkesh W., Jansen S., Simmel A., Modder B. (1988) *Eur. J. Clin. Invest.*, **18**(5), 512-516.
84. Nguyen H.A., Su Y., Lavie A. (2016) *J. Biol. Chem.*, **291**(34), 17664-17676.
85. Narta U.K., Kanwar S.S., Azmi W. (2007) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **61**(3), 208-221.
86. Красоткина Ю.В., Гладилина Ю.А., Соколов Н.Н. (2008) *Биомедицинская химия*, **54**(4), 482-486. [Krasotkina Yu.V., Gladilina Yu.A., Sokolov N.N. (2008) *Biomeditsinskaya Khimiya*, **54**(4), 482-486.]
87. Offman M.N., Krol M., Patel N., Krishnan S., Liu J.Z., Saha V., Bates P.A. (2011) *Blood*, **117**(5), 1614-1621.
88. Derst C., Henseling J., Röhm K.-H. (2009) *Protein Sci.*, **9**(10), 2009-2017.
89. Ardalan N., Mirzaie S., Sepahi A.A., Khavari-Nejad R.A. (2018) *Med. Hypotheses*, **112**, 7-17.
90. Yoshimoto T., Nishimura H., Saito Y., Sakurai K., Kamisaki Y., Wada H., Sako M., Tsujino G., Inada Y. (1986) *Jpn. J. Cancer Res.*, **77**(12), 1264-1270.
91. Białkowska A., Gromek E., Florczak T., Krysiak J., Szulcewska K., Turkiewicz M. (2016) in: *Biotechnology of Extremophiles: Grand Challenges in Biology and Biotechnology*. (Rampelotto P., ed.) Springer, Cham. pp. 399-444.
92. Warangkar S.C., Khobragade C.N. (2010) *Enzyme Res.*, Article ID 165878. DOI: 10.4061/2010/165878.

93. Покровская М.В., Александрова С.С., Веселовский А.В., Жданов Д.Д., Покровский В.С., Эльдаров М.А., Гришин Д.В., Гладиллина Ю.А., Торопыгин И.Ю., Соколов Н.Н. (2019) *Biomed. Chem. Res. Methods*, **2**(1), e00071. [Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Veselovsky A.V., Zhdanov D.D., Pokrovsky V.S., Eldarov M.A., Grishin D.V., Gladilina Yu.A., Toropygin I.Yu., Sokolov N.N. (2019) *Biomed. Chem. Res. Methods*, **2**(1), e00071.]
94. Janakiraman S. (2016) *MOJ Proteomics Bioinform.*, **2**(6), 171-175.
95. Mohapatra B.R., Bapuji M., Banerjee U. (1997) *Cytobios*, **92**, 370-371.
96. Husain I., Sharma A., Kumar S., Malik F. (2016) *PLoS One*, **11**(2), e0148877. DOI: 10.1371/journal.pone.0148877.
97. Kumar S., Venkata Dasu V., Pakshirajan K. (2011) *Biores. Technol.*, **102**(2), 2077-2082.
98. Li W.F., Zhou X.X., Lu P. (2005) *Biotechnol. Adv.*, **23**(4), 271-281.
99. Li A.N., Ding A.Y., Chen J., Liu S.A., Zhang M., Li D.C. (2007) *J. Microbiol. Biotechnol.*, **17**(4), 624-631.
100. de Azeredo L.A.I., Freire D.M.G., Soares R.M.A., Leite S.G.F., Coelho R.R.R. (2004) *Enzyme Microb. Technol.*, **34**(3-4), 354-358.
101. Hong S.-J., Lee Y.-H., Khan A.R., Ullah I., Lee C., Park C.K., Shin J.-H. (2014) *J. Basic Microbiol.*, **54**(6), 500-508.
102. Bentahir M., Feller G., Aittaleb M., Lamotte-Brasseur J., Himri T., Chessa J.P., Gerday C. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**(1), 11147-11153.
103. Thomas M.T., Scopes K.R. (1998) *J. Biochem.*, **330**(3), 1087-1095.
104. Levieux D., Geneix N., Levieux A. (2007) *J. Dairy Res.*, **74**(3), 296-301.
105. Golotin V., Balabanova L., Likhatskaya G., Rasskazov V. (2015) *Mar. Biotechnol. (NY)*, **17**(2), 130-143.
106. Singh A.K., Pindi P.K., Dube S., Sundareswaran V.R., Shivaji S. (2009) *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**(13), 4419-4426.
107. Izadpanah Qeshmi F., Homaei A., Fernandes P., Javadpour S. (2018) *Microbiol. Res.*, **208**, 99-112.
108. Jaenicke R., Böhm G. (1998) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**(6), 738-748.
109. Kleine R. (1982) *Acta Biol. Med. Ger.*, **41**(1), 89-102.
110. Tiberti M., Papaleo E. (2011) *J. Struct. Biol.*, **174**(1), 69-83.
111. Krasotkina J., Borisova A.A., Gervaziev Yu.V., Sokolov N.N. (2004) *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **39**, 215-221.
112. Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Pokrovsky V.S., Omeljanjuk N.M., Borisova A.A., Anisimova N.Y., Sokolov N.N. (2012) *Protein Expr. Purif.*, **82**(1), 150-154.
113. Cammack K.A., Marlborough D.I., Miller D.S. (1972) *Biochem. J.*, **126**, 361-379.
114. Li X., Zhang X., Xu S., Xu M., Yang T., Wang L., Zhang H., Fang H., Osire T., Rao Z. (2019) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **103**(17), 7055-7070.
115. Kelo E., Noronkoski T., Stoineva I.B., Petkov D.D., Mononen I. (2002) *FEBS Lett.*, **528**, 130-132.
116. Hong S.J., Park G.S., Ullah I., Shin J.H., Lee C. (2012) *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **55**, 213-218.
117. Jia M., Xu M., He B., Rao Z. (2013) *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 9428-9434.
118. Bhat M.R., Nair J.S., Marar T. (2015) *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **6**, 3599-3605.
119. Chohan S.M., Nisar M.A., Rashid N., Gharib G., Bashir Q., Siddiqui M.A. (2016) *Biologia*, **71**(12), 1315-1319.
120. Li X., Zhang X., Xu S., Xu M., Yang T., Wang L., Zhang H., Fang H., Osire T., Rao Z. (2019) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **103**(17), 7055-7070.

Поступила в редакцию: 29. 11. 2019.
После доработки: 11. 02. 2020.
Принята к печати: 03. 03. 2020.

L-ASPARAGINASES OF EXTREMOPHILIC MICROORGANISMS IN BIOMEDICINE

M.V. Dumina¹, M.A. Eldarov¹, D.D. Zdanov², N.N. Sokolov^{2*}

¹Research Center of Biotechnology RAS,

7/1 60-Letiya Oktyabrya ave., Moscow, 117312 Russia

²Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: Sokolov2144@yandex.ru

L-asparaginase is extensively used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia and several other lymphoproliferative diseases. In addition to its biomedical application, L-asparaginase is also of prospective use in food industry to reduce the formation of acrylamide, which is classified as probably neurotoxic and carcinogenic to human, and in biosensors for determination of L-asparagine level in medicine and food chemistry. The importance of L-asparaginases in different fields, disadvantages of commercial ferments, and the fact that they are widespread in nature stimuli the search for biobetter L-asparaginases from new producing microorganisms. In this regard, extremophile microorganisms exhibit unique physiological properties such as thermal stability, adaptability to extreme cold conditions, salt and pH tolerance and so provide one of the most valuable sources for novel L-asparaginases. The present review summarizes the recent results on studying the structural, functional, physicochemical and kinetic properties, stability of extremophilic L-asparaginases in comparison with their mesophilic homologues.

Key words: L-asparaginase; antitumor drug; extremophilic microorganisms; stability; structural and functional properties

Funding. The work was performed with partial financial support of RFBR grant foundation (grant no. 19-08-01112 A, literature review for L-ASPases of extremophiles), as well as in the framework of the Program for Basic Research of the State Academies of Sciences for 2013-2020 (results of on-hold research studies for L-ASPases of mesophilic microorganisms).

Received: 29.11.2019, revised: 11.02.2020, accepted: 03.03.2020.