

На правах рукописи

ГЛАДИЛИНА Юлия Алексеевна

КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА
L-АСПАРАГИНАЗЫ *HELICOBACTER PYLORI* С
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2008

Работа выполнена в Государственном учреждении Научно-исследовательском институте биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук.

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Красоткина Юлия Валерьевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Колесанова Екатерина Федоровна
доктор биологических наук, профессор
Шишкин Сергей Сергеевич

Ведущая организация: Центр «Биоинженерия» РАН
Защита состоится «__» октября 2008 г. в ____ часов на заседании
Диссертационного совета Д 001.010.01 при ГУ НИИ БМХ РАМН по
адресу: 119121, г. Москва, Погодинская ул., д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ БМХ РАМН.

Автореферат разослан «__» _____ 2008 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат химических наук.



Карпова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Данная работа посвящена одной из актуальнейших проблем современной биохимии, онкологии и медицины – созданию эффективных препаратов, подавляющих рост опухолевой клетки в результате целенаправленного воздействия на ее метаболизм. На сегодня единственным примером практического использования ферментов в онкотерапии является применение бактериальной аспарагиназы в схемах комбинированной химиотерапии острых лимфобластных лейкозов, лимфо-и ретикулобластом (Narta U.K., 2007).

Аспарагиназа (L-аспарагин-амидогидролаза; КФ 3.5.1.1.) катализирует гидролиз аспарагина с образованием аспарагиновой кислоты и иона аммония. Именно это свойство аспарагиназы и определяет ее противоопухолевое действие. При введении аспарагиназы в организм человека происходит снижение концентрации аспарагина в крови и тканевой жидкости. В лейкозных клетках, в отличие от нормальных тканей, активность аспарагинсинтазы снижена или полностью отсутствует. При уменьшении концентрации экзогенного аспарагина лейкозные клетки испытывают дефицит этой аминокислоты, происходит ингибирование синтеза белка и нуклеиновых кислот, и, в конечном счете, гибель раковой клетки. Таким образом, достигается избирательная регрессия опухолевой ткани при терапии аспарагиназой.

Несмотря на большое число бактериальных аспарагиназ с установленным противоопухолевым действием, только два фермента *Escherihia coli* (EcA) и *Erwinia chrysanthemi* (ErA) используются в клинической практике (Wriston J.J., et al, 1995). Широкий спектр функциональных нарушений, индуцированных применением аспарагиназы, включает в себя поражения печени и поджелудочной железы, панкреатит, тромбозы и эмболии, нейротоксичность и подавление иммунной системы. (Narta U.K, 2007).

Основной причиной токсичности аспарагиназы принято считать снижение уровня внеклеточного глутамина вследствие частичной глутаминазной актив-

ности фермента. Kafkewitz и соавт. суммировали в своем обзоре результаты экспериментальных работ, которые показывают, что дефицит глутаминна в организме заметно подавляет функцию иммунной системы, в то время как дефицит аспарагина такого действия не оказывает (Kafkewitz, et al, 1983). Поэтому поиск новых аспарагиназ с низкой глутаминазной активностью является актуальной задачей медицинской биохимии.

Попытки сделать аспарагиназу менее токсичной традиционно предпринимаются двумя путями. Первый из них предполагает снижение глутаминазной активности направленным мутагенезом аминокислотных остатков, определяющих субстратную специфичность фермента. Глутаминазная активность наиболее удачного мутанта EsA N248A была снижена в 2 раза по сравнению с ферментом дикого штамма. (Derst C, et al, 2000). Однако аспарагиназная активность этого производного EsA также была снижена и при физиологических условиях составляла не более 12% от первоначальной.

Второй подход, состоящий в поиске новых аспарагиназ с низкой глутаминазной активностью, и был реализован в данной работе.

Цель и задачи исследования.

Цель работы состояла в разработке метода получения рекомбинантной аспарагиназы *H. pylori* и характеристике ее терапевтически значимых свойств.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи исследования:**

1. Клонирование и экспрессия гена HpA в клетках *E.coli*. Получение рекомбинантного штамма-продуцента, обеспечивающего устойчивую экспрессию HpA.
2. Разработка лабораторного способа выделения гомогенного препарата HpA, пригодного для создания на его основе крупномасштабного метода получения фермента.
3. Характеристика терапевтически значимых физико-химических и каталитических свойств HpA.
4. Определение цитотоксической активности HpA по отношению к клеткам

лейкозов человека.

5. Сравнение антигенности НрА и основной терапевтической аспарагиназы ЕсА.

Научная новизна работы, прежде всего, состоит в выделении и характеристике новой бактериальной аспарагиназы. Впервые клонирован ген периплазматической аспарагиназы из штамма *Helicobacter pylori*, получен рекомбинантный штамм *E.coli*, продуцирующий НрА. Разработаны оптимальные условия экспрессии, простой и эффективный способ очистки, что позволило впервые получить гомогенный препарат НрА. Проведена детальная характеристика физико-химических и каталитических свойств НрА. Определены кинетические константы гидролиза основных физиологических субстратов НрА – аспарагина и глутамина. Показано, что глутаминазная активность фермента не превышает 0,01% от аспарагиназной активности. Установлено, что НрА обладает высокой цитотоксической активностью в отношении клеток острого лимфобластного лейкоза MOLT-4, лимфомы Беркитта Raji, а также хронического миелоидного лейкоза K-562. Показано, что НрА вызывает гибель лейкозной клетки по механизму апоптоза. Установлено, что НрА иммунохимически отлична от аспарагиназы *E.coli*.

Практическая значимость исследования.

Результаты, полученные в данной работе, могут быть применены для разработки нового противолейкозного препарата. Острый лимфобластный лейкоз является самым частым онкологическим заболеванием в педиатрии. На его долю приходится более 30% всех опухолей у детей (Павлова М.М., 1996). Ежегодно в России, регистрируют до 3000 новых случаев этого заболевания (Кривошеина Е.Л., 2005). Установленные в данной работе свойства НрА обеспечат лекарственному препарату на его основе ряд существенных преимуществ перед современными терапевтическими аспарагиназами: (а) низкая токсичность позволит избежать развития множества побочных эффектов, типичных для аспарагиназной терапии; (б) низкая себестоимость его производства как рекомбинантного фермента уменьшит стоимость лечения; (в) отличная от ЕсА антигенность

НрА, указывает на возможность использования фермента для заместительной аспарагиназной терапии. Учитывая, что в нашей стране аспарагиназа никогда не производилась, результаты данной работы представляют интерес в качестве основы для создания первого отечественного препарата для лечения различных форм лейкозов.

Апробация работы.

Основные результаты диссертационной работы доложены на научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2007), Международной научной конференции «Перспективы современной медицинской науки» (Винница, 2007), международном конгрессе «ПЕРСПЕКТИВА-2007» (Нальчик, 2007).

По материалам диссертации опубликовано 2 статьи и 5 публикаций в сборниках докладов научных конференций.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 147 источников. Работа изложена на ___ страницах машинописного текста, содержит 32 рисунка и 11 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Клонирование и экспрессия НрА.

В работе использовались стандартные методы генетики *E. coli*. В качестве источника гена аспарагиназы НрА была использована геномная ДНК *Helicobacter pylori*, любезно предоставленная К. Мамонолиевым (ЗАО «ПИННИ», www.rupny.ru). Ген был выделен методом амплификации. Нуклеотидная последовательность, соответствующая гену НрА по сайтам рестрикции *EcoRI* и *NotI*, была вставлена в ТА-вектор *pGEM-T Easy* («Promega»). Для целей данной работы ген НрА был переклонирован в вектор *pACHC177* по сайтам рестрикции *EcoRI* и *NotI*, а также в вектора *pET22 (NcoI, NdeI u NotI)* и *pET11 (NdeI u NotI)*. Манипуляции с ДНК осуществлялись в соответствии со стандартными протоколами (Маниатис Т. и др., 1984).

Культивирование штамма-продуцента *E.coli* проводили в конических колбах Эрленмейера (объемом 250 или 1000 мл) на термостатируемой качалке «GFL» (Германия) при 37°C. Объем LB-среды составлял 50 или 200 мл, в зависимости от объема колб.

Выделение рекомбинантного фермента методом колоночной хроматографии. Все стадии очистки проводили при 4°C. 10-12 г биомассы *E. coli*, суспендировали в 20 мМ калий-фосфатном буфере, рН 5,8 (буфер А), до общего объема смеси 85 мл. Клетки разрушали ультразвуком (Дезинтегратор УЗДН-2Т, Россия) в течение 5 мин при режиме: 30 с озвучивания, 30 с перерыв. Разрушение клеток проводили на ледяной бане, поддерживая $t=2-4^{\circ}\text{C}$. Далее рН суспензии доводили 1М NaH_2PO_4 до 5,8 и оставляли при 4°C и непрерывном перемешивании на 30 мин для преципитации части балластных белков. Растворимую фракцию клеточного экстракта получали центрифугированием при 18000 об/мин (30мин) и наносили на колонку с SP-Сефарозой FF (2.5 см x 10 см), уравновешенную буфером А. После нанесения белка SP-Сефарозу последовательно промывали соответствующим буфером до исчезновения следов белка в элюате. Скорость нанесения образца и промывки колонки составляли от 0,5 до 3 мл/мин. Элюцию проводили 100 мл буфера А с рН 7,0, при скорости 1 мл/мин. Фракции, содержащие L-аспарагиназу, объединяли. Объединенные фракции помещали в ячейку-концентратор Amicon объемом 12 мл, содержащую фильтр Millipore (Ultrafiltration membrane NMWL 30000) и центрифугировали (Beckman, JA-25,5 4000 об/мин).

Определение концентрации белка.

Белок определяли модифицированным методом Лоури (Hartree E.,1991), а также через коэффициент экстинкции $\varepsilon^{0,1\%}_{280}=0,61$ (ProtParam, www.exPASy.org).

Электрофорез белков в денатурирующих условиях осуществляли в соответствии с методикой (Laemmli, 1970), аспарагиназную активность определяли по методу Несслера (Wriston J., 1973), изоэлектрическое фокусирование проводили, как описано у Остерман М., 1983.

Определение кинетических параметров аспарагиназы.

Скорости гидролиза L-аспарагина и L-глутамина определяли спектрофотометрически по убыванию поглощения амидной связи при 215 нм ($A\varepsilon_{215} = 102,5$) с помощью спектрофотометра «Hewlett Packard» (Howard et.al., 1972). Для этого 27-1350 мкМ фермента добавляли к 2 мл 12,5 мМ боратного буфера, содержа-

шего субстраты в концентрации 30-3600 мкМ. Реакцию проводили при 37°C.

Определение цитотоксической активности аспарагиназы *in vitro* *

Для определения влияния аспарагиназы на пролиферацию тест-культуры и оценки силы ее прямого токсического действия на чувствительные к аспарагиназе клеточные линии K-562 (хронический миелоидный лейкоз), Raji (лимфома Беркитта), MOLT-4 и Jurkat (острый лимфобластный Т-клеточный лейкоз), а также нечувствительные к аспарагиназе фибробласты легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ) использовали микроколориметрический метод – МТТ-тест. Метод основан на редукции тетразолевого кольца 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил) 2,5-дифенилтетразолиум бромид (ММТ) дегидрогеназами митохондрий только живых клеток с образованием нерастворимых фиолетовых кристаллов формазана. После осаждения клеток, среду осторожно и тщательно удаляли, образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в диметилсульфоксиде и измеряли оптическую плотность при длине волны 540 нм на «Multiscan» EX («Labsystems»). Результаты эксперимента выражали в % к контролю.

Выживаемость клеток (CS) рассчитывалась по формуле:

$$C=ODa/ODk*100\%,$$

где ODa – оптическая плотность в лунках с клетками, инкубированными с аспарагиназой; ODk – средняя оптическая плотность в контрольных лунках с клетками, инкубированными без аспарагиназы.

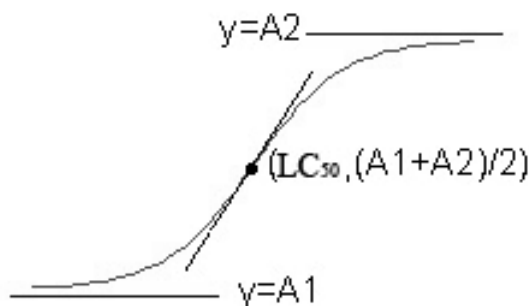
Для характеристики цитотоксического эффекта использовали значение LC₅₀ – концентрация препарата, приводящая к гибели 50% клеток, которое вычисляли путем аппроксимации кривой сигмоидной формы (рис.1) данных нескольких параллельных измерений для каждой концентрации препарата аспарагиназы.

$$CS(E) = A_1 + (A_2 - A_1) / (1 + 10^{(LC_{50} - E)p}),$$

где A₁, A₂ – нижняя и верхняя асимптоты, E- концентрация фермента, p- параметр аппроксимации.

* Работа проводилась совместно с к.б.н. Посыпановой Г.А. (ММА им. И.М. Сеченова) и д.б.н. Абакумовой О.Ю. (ГУ НИИ БМХ РАМН)

Рис.1. Выбранная для аппроксимации выживаемости клеток кривая сигмоидной формы.



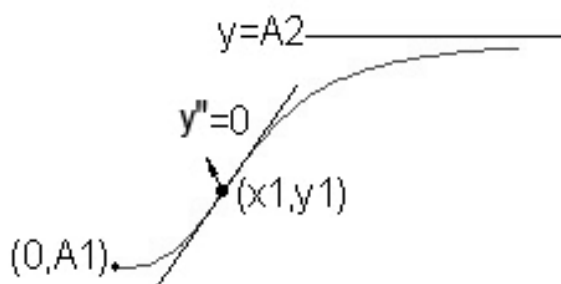
Морфологические признаки апоптоза, индуцируемого в лейкозных клетках аспарагиназой НрА, выявляли методом световой микроскопии, а также путем определения конденсации хроматина с использованием флуоресцентного микроскопа после окраски лейкозных клеток Hoechst 33258 (2-(4-гидроксифенил)-5-(4-метил-1-пиперазинил)-2,5-би-1Н-бензимидазолтригидрохлорид) (Yuste V.J., 2005).

Получение специфических поликлональных антител. В эксперименте использовали беспородных белых мышей-самцов с массой тела 19-22 г. Антиген вводили с помощью внутрибрюшинных инъекций в количестве 25 мкг в 0,2-0,3 мл физиологического раствора, содержащего 50% полного адьюванта Фрейнда. Мышей иммунизировали на 7, 14 и 21-е сутки. Забор крови проводили декапитацией мышей на 28-й день. Кровь оставляли для свертывания при 37°C на 1 час. Отбирали аликвоты сывороток по 50-100 мкл и хранили при -20°C.

Определение уровня выработки антител методом прямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Для проведения ИФА использовали планшеты высокой сорбционной емкости («Nunc», марки «Polysorp»). Антиген в концентрации 20 мкг/мл сорбировали в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере, рН 9,6, в течение ночи. В качестве блокирующего раствора применяли 50%-ное молоко 0,5%-ной жирности в 0,01 М фосфатно-солевом буфере, рН 7,4 (PBS). Начальное разведение антисывороток варьировало от 1:2 до 1:4 в зависимости от титра специфических антител. Оптимальное начальное разведение (для достижения конечной точки титрования) определяли по результатам предварительного эксперимента, проводимого в тех же условиях. Конъюгаты антимышинных козых IgG с пероксидазой хрена («Stressgen») разводили 1:2000 в

PBS, содержащий 50%-ное обезжиренное молоко и 0,05% Tween 20. В качестве субстрата использовали 0,5 мг/мл ABTS в 0,1 М цитратном буфере, 1% H₂O₂, pH 4,0. Непосредственно перед инкубацией добавляли H₂O₂ до конечной концентрации 1%. Реакцию останавливали внесением в лунки 100 мкл 1%-ного раствора SDS и измеряли оптическую плотность при длине волны 405 нм на планшетном фотометре «Multiscan» EX («Labsystems»). За титр принимали точку перегиба сигмоидной кривой логистического регрессионного уравнения ($y=A_2 + (A_1-A_2)/(1+(x/x_0)^p)$), аппроксимирующей данные нескольких независимых экспериментов (рис.2) (Свежова Н.В. и др., 2008).

Рис.2. Выбранная для аппроксимации оптической плотности кривая сигмоидной формы.



Статистическую обработку результатов проводили с помощью программных продуктов «OriginLab Origin 7.0» и «Microsoft Excel 2003». Достоверность полученных результатов определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Клонирование гена HpA.

Цель данной работы состояла в получении аспарагиназы с низкой глутаминазой активностью. В настоящее время только один фермент из штамма *Wolinella succinogens* (WsA), претендует на звание аспарагиназы, свободной от глутаминазой активности (0,015 % от аспарагиназой активности) (Distasio J., et al, 1972). Однако эти данные не были подтверждены для рекомбинантного фермента, экспрессированного в *E.coli* (Derst C. et al, 2000). Тем не менее, за отсутствием другой отправной точки, было решено получить фермент наиболее гомологичный WsA. Поиск по подобию в базе белковых и транслированных нуклеотидных последовательностей GeneBank, (доступных на сервере NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) программой BLAST с использованием аминокислотной последовательности аспарагиназы WsA (CAA61503) показал, что аспарагиназа

штамма *Helicobacter pylori* (NP_223379) является одним из 10 наиболее близких гомологов WsA. Степень идентичности HpA и WsA составляет 53%, а гомологии – 73%.

Бактериальные аспарагиназы 2-го типа являются периплазматическими ферментами, которые характеризуются наличием сигнального пептида. Наличие сигнального пептида в аминокислотной последовательности HpA было предсказано с вероятностью 0,98 программой SignalP 3.0 (Nielsen H. et al, 1997, Dyrlov J., et al, 2004). Положение сайта протеолиза между Glu20 и Asn21 аминокислотными остатками было определено с вероятностью 0,965.

На основе анализа нуклеотидной последовательности mRNA аспарагиназы HpA, были подобраны праймеры для амплификации гена предшественника аспарагиназы и фрагмента гена, соответствующего процессированной форме фермента. Обратный праймер использовался для амплификации обеих форм. Фрагменты ожидаемого размера были амплифицированы после оптимизации параметров ПЦР (рис.3). Температура отжига, равная 54°C, обеспечивала максимальный выход ПЦР-продукта, тем не менее, эффективность амплификации полноразмерной формы гена HpA была существенно ниже, чем для его процессированной формы.

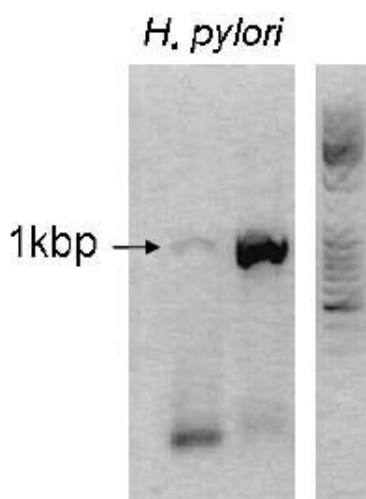


Рис.3. ПЦР-продукты амплификации (1) полноразмерного гена HpA и (2) его фрагмента, соответствующего процессированной форме фермента. (3) Маркер молекулярных масс (Fermentas, #SM0332)

После экстракции из 1%-ного агарозного геля фрагменты ДНК были клони-

рованы в ТА-вектор *pGEM-T Easy* («Promega»). Селекция клонов, предположительно содержащих целевые амплификаты, была проведена с помощью белого теста (Zhou M.Y. et al, 1995, Kobs G., 1997).

Рестрикция ферментом *EcoRI* плазмиды *pGEM-TEasy*, выделенной из отобранных трансформантов, показала наличие вставки размером ~1 кб (рис. 4). Вектор, несущий полноразмерный ген *HpA*, был обозначен *pGEM-T/HpA-P*, а плазида, содержащая фрагмент гена, соответствующий процессированной форме аспарагиназы, был назван *pGEM-T/HpA-M*.

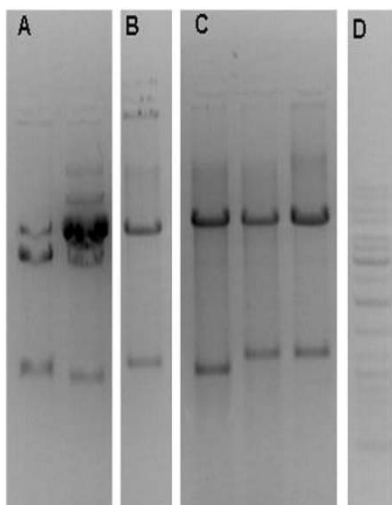


Рис.4. Рестрикционный анализ плазмид *pGEMT/HpA-P*, *pGEMT/HpA-M* *EcoRI*-фрагменты(A); *pACYC/HpA-P*, *EcoRI-NotI* фрагменты(B); *pET22/HpA-M*, *Nco-NotI* фрагменты; *pET22/HpA-P*, *NdeI-NotI* фрагменты; *pET11/HpA-M*, *NdeI-NotI* фрагменты(C); маркер молекулярных масс (Fermentas, #SM0332) (D).

Секвенирование показало, что последовательности *HpA-P* и *HpA-M* идентичны нуклеотидным последовательностям гена аспарагиназы *Helicobacter pylori*. Аналогично были получены плазмиды *pGEM-TEasy*, содержащие последовательности *HpA-P* и *HpA-M*, которые фланкированы сайтами рестрикции *NdeI* или *NcoI* с 5'-конца.

EcoRI/NotI фрагменты *pGEM-TEasy/HpA-P* были клонированы в экспрессирующий вектор *pACYC177*. Именно этот клон и был использован в дальнейшей работе. Полученная в результате плазида *pACYC177/HpA-P* была трансформирована в клетки *E.coli 21(DE3)*. Однако после индукции экспрессии *HpA* синтеза рекомбинантного фермента не наблюдалось (рис. 5). Удельная аспарагиназная активность биомассы после индукции составляла $1,2 \pm 0,4$ МЕ/мг, что соот-

ветствует активности нетрансформированной культуры *E. coli* 21(DE3).

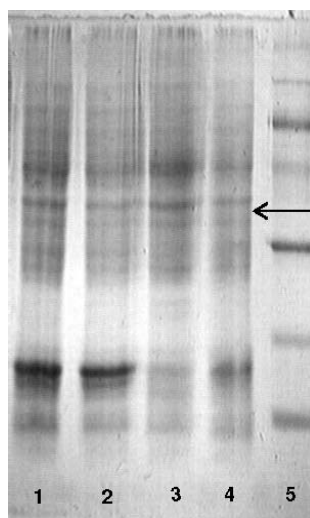


Рис. 5. Электрофореграмма клеточного экстракта *E. coli* 21(DE3) с плазмидой *pACYC177/HpA-P* до (1) и после индукции 1мМ (2), 0,5 мМ (3) и 0,1 мМ ИРТГ(4).

Основными возможными причинами отсутствия экспрессии могли являться:

1. Наличие «редких» кодонов в нуклеотидной последовательности HpA.
2. Неузнавание сигнального пептида HpA транспортными белками *E. coli*.
3. Токсичность каталитически активной формы HpA для клетки-производителя.

Первые две причины являются следствием существенной таксономической удаленности штаммов *E. coli* и *H. pylori*. Токсичность же является следствием дефицита аспарагина при экспрессии рекомбинантной аспарагиназы. Для устранения этих причин была проведена оптимизация экспрессии HpA.

Оптимизация генетической конструкции для экспрессии HpA в клетках *E. coli*.

Экспрессия чужеродного белка в *E. coli* может оказаться неэффективной, если нуклеотидная последовательность соответствующего гена содержит так называемые «редкие» кодоны, т.е. такие триплеты, для которых концентрация тРНК является очень низкой.

Поиск редких кодонов в нуклеотидной последовательности HpA выявил их наличие в гене аспарагиназы. Тем не менее, отсутствие tandemных повторов позволило предположить, что в данном случае эти триплеты не оказывают решающего влияния на экспрессию белка.

Для того, чтобы проверить это предположение HpA-М был клонирован в *pET11* для его экспрессии под регуляцией сильного T7 промотора, но в заведо-

мо неактивной форме, благодаря включению 6-ти гистидинов и сайта расщепления TEV-протеазой на N-конце. Уровень экспрессии в данном случае был ожидаемо высоким (рис. 6). Этот результат показывал, что наличие редких кодонов не препятствует синтезу полипептидной цепи НрА в клетках *E.coli*. Аналогичный результат был получен при экспрессии НрА-Р с использованием плазмиды *pET22/ НрА-Р*. В данном случае также наблюдалось постепенное накопление рекомбинантного белка в клетке-продуценте, однако фермент экспрессировался исключительно в виде телец включения (рис. 7). Увеличения аспарагиназной активности в культуре после внесения индуктора не наблюдалось. Синтезируемый в виде предшественника фермент не подвергался посттрансляционной модификации, т.к., по всей видимости, сигнальный пептид НрА не узнавался транспортными белками и протеазами *E.coli*.

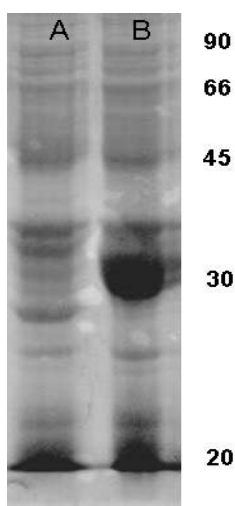


Рис.6. Экспрессия неактивной формы НрА под контролем T7 промотора. Электрофорез в 12% ПААГ/ДСН клеточного экстракта *BL21(DE3)/pET1-НрА-М* до (А) и после (В) 24 часовой индукции 1мМ ИПТГ.

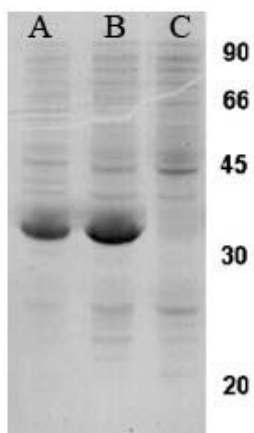


Рис.7. Экспрессия НрА-Р под контролем T7 промотора. Электрофорез в 12% ПААГ/ДСН клеточного экстракта *BL21(DE3)/pET22-НрА-Р* до (С) и после 8 (А) и 24 часовой (В) индукции 1мМ ИПТГ.

Для обеспечения правильной посттрансляционной модификации, фрагмент гена НрА, соответствующий процессированной форме фермента, был клониро-

ван в плазмиду *pET22* непосредственно за последовательностью *relB*. Полученный вектор был назван *pET22b/HrArelB*. В результате HrA был экспрессирован в виде химерного предшественника с сигнальным пептидом на N-конце для направленной секреции рекомбинантного фермента в периплазму *E.coli*. При использовании этой генетической конструкции после индукции синтеза белка удельная активность культуры-продуцента увеличивалась до 5-6 МЕ/мг, что соответствовало ~5% активного рекомбинантного фермента от общего белка *E.coli*.

Экспрессия рекомбинанной аспарагиназы HrA.

Единичную колонию рекомбинантного штамма инокулируют в 5 мл среды LB и выращивают в течение 18-20 часов при 37°C и непрерывном перемешивании. Адаптированную культуру используют для приготовления необходимого объема посевного материала для ферментации, которую проводят при 37°C с использованием среды LB в условиях непрерывной аэрации и перемешивания. Экспрессию HrA индуцируют ИПТГ конечной концентрации 0,5 мМ, который добавляют в среду при достижении культурой оптической плотности $OD_{600}=0,6$. После этого клетки инкубируют 16-18 часов при 37°C. Клетки собирают центрифугированием при 4000 g в течение 15 мин и либо сразу используют для выделения аспарагиназы HrA, либо хранят в замороженном виде при – 20°C.

Выделение аспарагиназы HrA.

На начальном этапе работы необходимо было получить препарат аспарагиназы в количестве, достаточном для определения терапевтически значимых свойств фермента.

Наибольшие потери фермента происходят на начальной стадии получения бесклеточного экстракта. Для получения бесклеточного экстракта мы решили использовать ультразвуковую обработку. Результаты очистки фермента представлены в таблице 6. Аспарагиназная активность в бесклеточном экстракте составляла 5,1 МЕ/мг, что соответствует 5-6% активного фермента от общего количества белка. При последующем центрифугировании, вероятно вследствие адсорбции L-аспарагиназы осадком разрушенных клеток, терялось 15-20%

ферментативной активности, однако, на этой стадии происходило и удаление почти 50% балластных белков. Таким образом, выход фермента был достаточно высоким (около 80%). Нанесение растворимой фракции бесклеточного экстракта на SP-Сефарозу при pH 5,8 позволило избавиться от основной массы балластных белков. Значение ИЭТ рекомбинантной аспарагиназы равно 8,1,

Таб.1. Типичная процедура выделения НрА.

Стадии очистки	Объем, мл	Белок, мг	Активность, МЕ	Удельная активность, МЕ/мг	Выход, %	Степень очистки
Бесклеточный экстракт	75	602	3096	5,1	100	1
Растворимая фракция бесклеточного экстракта, pH 7,2	100	462	2900	6,2	94	1,2
Растворимая фракция бесклеточного экстракта, pH 5,8	102	375	2443	6,5	79	1,3
Хроматография на SP-сефарозе	6	21	1911	91	62	18

поэтому более 95% аспарагиназы *H. pylori*, нанесенной на сильный катионообменник SP-Сефарозу при pH 5,8, связывается с сорбентом, а большинство белков *E. coli*, имеющих ИЭТ в кислой области pH, обнаруживается в элюате. После промывки сорбента низкосолевым фосфатным буфером с pH 5,8, аспарагиназу элюировали тем же раствором при pH 7,0. Использование однокомпонентного элюата вместо градиента концентрации соли исключало необходимость дальнейшего обессоливания и концентрирования белка, а также позволяло значительно облегчить процесс выделения рекомбинантной аспарагиназы. После хроматографической стадии очистки удельная активность фермента составляла 91 МЕ/мг, что в 18 раз превышает значение исходной активности.

При электрофорезе очищенного препарата аспарагиназы в 12%-ном полиакриламидном геле выявляется один основной компонент с молекулярной массой 34 кДа, свидетельствующий о содержании целевого фермента в полученном препарате более 90% (рис.8). Иногда могут наблюдаться несколько минорных компонентов с Мг 15-30 кДа. Аналогичные компоненты присутствуют и в препаратах аспарагиназы *Erw. chrysanthemi* («Sigma») и аспарагиназы *E. coli* про-

изводства Медак, предназначенных для внутривенного введения (рис.9).

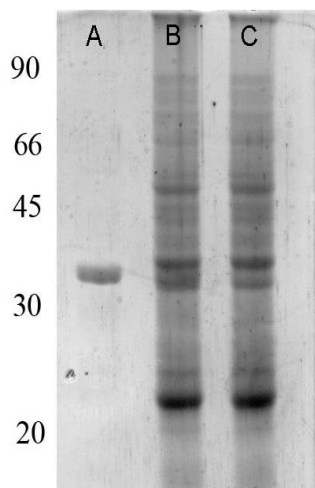
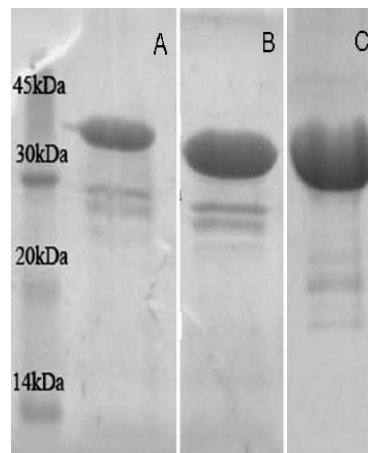


Рис.8. Электрофорез в 12% ПААГ/ДСН. Очищенный препарат аспаргиназы НрА(А); клеточный экстракт *BL21(DE3)pLYSE/pET22-НрА-М* до (С) и после (В) 24 часовой индукции 0,5мМ ИПТГ;

Рис.9. Присутствие низкомолекулярных компонентов в водных растворах аспаргиназ *ErA(A)*, *EcA (B)* и *НрА(C)*. Электрофорез в 12% ПААГ/ДСН.



Эти компоненты, количество которых увеличивается при хранении раствора фермента, являются продуктами гидролиза аспаргиназы, по-видимому, вследствие присутствия следовых количеств протеаз. Мы не использовали ингибиторы протеаз в процессе выделения, т.к. они являются высокотоксичными соединениями, присутствие которых недопустимо в препарате, предназначенном для внутривенного использования.

Характеристика рекомбинантной НрА.

Физико-химические свойства НрА.

Цель физико-химической характеристики рекомбинантного фермента состояла, прежде всего, в определении терапевтически-значимых свойств аспаргиназы (табл.2), а также стабильности при денатурирующих условиях и при хранении.

Табл.2. Физико-химические свойства НрА

Свойство	Значение
Молекулярная масса, ПААГ/ДСН (субъединица)	34 000
рН-оптимум	5,0 – 9,0
Температура денатурации	65°C
<i>pI</i>	8,1

Зависимость удельной активности НрА определяли в диапазоне рН от 5 до 9. При этом использовали калий-фосфатный (рН 5 – 7) и Трис-НСl (рН 7,5 – 9)

буферные растворы. Рекомбинантный фермент оказался каталитически активным в широком диапазоне рН (рис. 10). Температурный оптимум действия фермента определен в диапазоне температур от 37°C до 55°C. Увеличение активности фермента при повышении температуры вызвано снижением энергии активации реакции (Oakley et al., 1997; Peng et al., 2003), а резкое падение активности связано с тепловой денатурацией белка.

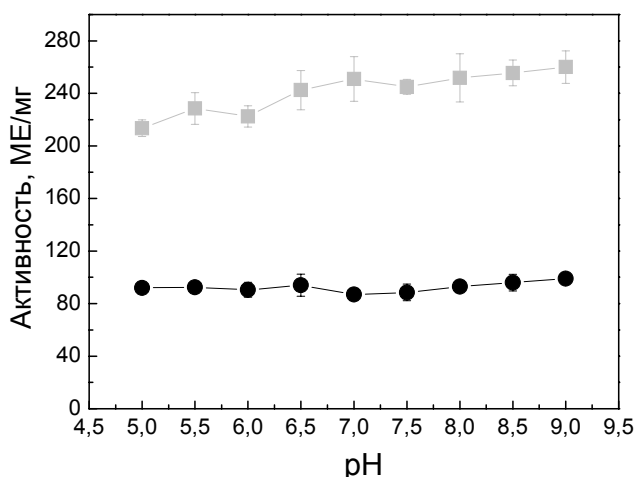


Рис.10. Зависимость удельной активности НрА(●) и ЕсА(■) от рН.

Учитывая возможную перспективу создания лекарственного препарата на основе НрА, представлялось интересным исследовать стабильность рекомбинантной аспарагиназы под воздействием различных денатурирующих факторов. При этом, в тех же экспериментах измеряли и стабильность лекарственного препарата ЕсА (Медак, Германия) для того, чтобы сравнить соответствующие свойства этих двух аспарагиназ.

Температуру денатурации ферментов определяли по изменению их удельной активности. Можно видеть (рис. 11), что инкубация при температурах до 60°C практически не изменяет активность рекомбинантного фермента. При нагревании раствора НрА выше 60°C происходит его инактивация. При этом ренатурации аспарагиназы в каталитически активную форму не наблюдается. Аналогичное поведение обнаруживает ЕсА, однако в данном случае снижение активности при температуре 60°C и выше не такое резкое, как для НрА.

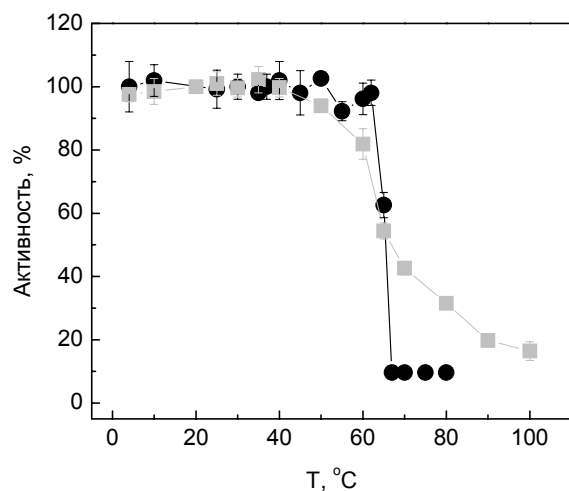


Рис.11 Термостабильность HpA(●) и EcA(■)

Сходные данные были получены при определении стабильности аспарагиназы в растворе мочевины (рис.12).

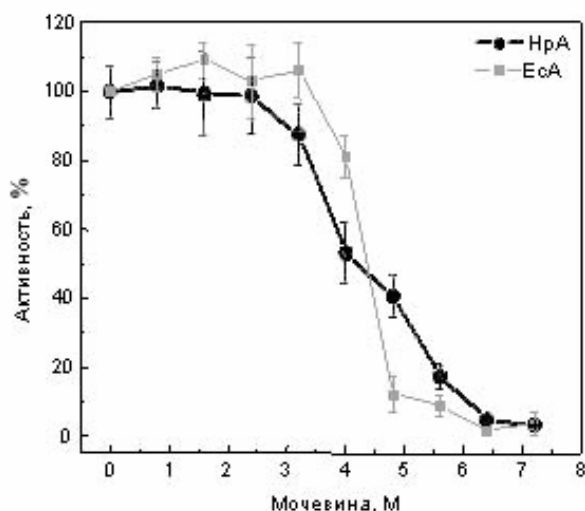


Рис.12. Стабильность HpA(●) и EcA(■) в растворе мочевины.

Стабильность рекомбинантного фермента также оценивали при многократных циклах замораживания – оттаивания, как это описано у (Jameel F., et al, 1997). Как показывают результаты (рис. 13), после 50 повторных циклов замораживания-оттаивания HpA сохраняет не менее 80% удельной активности от первоначального значения. В этом эксперименте стабильность рекомбинантного фермента оказалась практически такой же, как и стабильность аспарагиназы EcA (Медак).

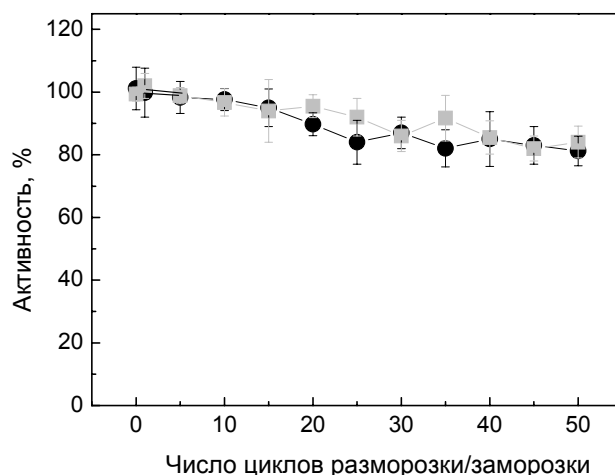


Рис. 13. Стабильность аспарагиназ HpA(●) и EsA(■) при многократных циклах замораживания-оттаивания

Каталитические свойства аспарагиназы HpA.

Кинетические параметры гидролиза субстратов под действием HpA.

Для рекомбинантной аспарагиназы HpA характерна гиперболическая зависимость скорости гидролиза обоих стереоизомеров аспарагина. Соответствующие кинетические параметры HpA суммированы в табл. 3.

Как и ожидалось, глутаминазная активность HpA, измеренная при концентрации L-Gln 5мМ, оказалась крайне низкой, 0,0083 МЕ/мл, что составляет 0,0009% от аспарагиназной активности. Эти данные сопоставимы с каталитическими свойствами WsA (табл. 3) (Distasio J. et al, 1972). Нам не удалось определить зависимость скорости гидролиза глутамината от его концентрации вследствие крайне низкой скорости реакции. До концентрации 5 мМ скорость гидролиза линейно повышается с увеличением концентрации глутамината. Мы не использовали концентрации L-Gln больше 5 мМ, т.к. оптическая плотность такого раствора глутамината в фосфатном буфере превышает 1,5, что препятствует адекватному измерению скорости гидролиза.

Табл. 3. Сравнение равновесных кинетических параметров для реакций гидролиза L-, D-аспарагина и L-глутамина аспарагиназами HpA¹, WsA², EcA³ и EwA⁴

	V_{\max} , мкМоль/мг·мин	k_{cat} , с ⁻¹	K_m , мкМ	k_{cat}/K_m , М ⁻¹ с ⁻¹
L-Asp				
HpA	94	103	21	$5,2 \cdot 10^6$
WsA	204	n/d	n/d	n/d
EcA	220	240	15	$1,6 \cdot 10^6$
EwA	560	321	98	$3,3 \cdot 10^6$
D-Asp				
HpA	2,6	1,5	3940	$3,8 \cdot 10^2$
WsA	6,5	n/d	n/d	n/d
EcA	n/d	n/d	n/d	n/d
EwA	24	14	832	$1,7 \cdot 10^4$
L-Gln				
HpA	0,0083	n/d	n/d	n/d
WsA	0,015	n/d	n/d	n/d
EcA	3	0,33	3500	94
EwA	15	8,6	1400	$6,1 \cdot 10^3$

¹-результаты данного исследования. Расчет k_{cat} был сделан в предположении одного активного центра на один мономер аспарагиназы с M_r 35 кДа; ²-скорость гидролиза определена для концентрации субстрата 40 мМ (Distasio J. and Niederman R., 1976); ³-(Derst C. Et al, 2000); ⁴-(Krasotkina et al, 2004); ⁵-скорость гидролиза L-Gln определена при концентрации субстрата 5мМ.

Кинетические эксперименты показывают, что введение HpA обеспечит эффективное снижение уровня аспарагина, но при этом концентрация глутамин в крови останется фактически неизменной.

Цитотоксическая активность HpA.

Ингибирование роста лейкозных клеток. Исследования цитотоксической активности HpA показали, что фермент эффективно ингибирует рост клеток лейкоза человека (рис.14). Антипролиферативная активность HpA имеет выраженную концентрационную зависимость. Наибольшую чувствительность показали клетки лимфомы Беркита Raji. Через 72 часа инкубации с 0,6 МЕ/мл HpA количество клеток этой линии уменьшалось на 50% по сравнению с контролем. Значение IC50 для клеток острого лимфобластного лейкоза MOLT-4 составляло 1 МЕ/мл. Аналогичные данные были получены для линии Jurkat. Наименее чув-

ствительной к действию аспарагиназы НрА оказалась линия хронической миелоидной лейкемии К-562. В этом случае 50%-ное ингибирование роста клеток достигалось при концентрации фермента более 2,1 МЕ/мл. Эти результаты находятся в хорошем соответствии с литературными данными относительно цитотоксичности бактериальных аспарагиназ, в частности нативной и рекомбинантной аспарагиназ из штамма *E.coli*, а также коммерческого препарата аспарагиназы *Erwinia chrysanthemi*.

В тоже время аспарагиназа НрА не подавляла рост культуры фибробластов, которые не являются чувствительными к действию аспарагиназы. Это показывает, что цитотоксичность в отношении лейкозных клеток является специфической и проявляется только для клеток, которые зависят от внеклеточного уровня аспарагина.

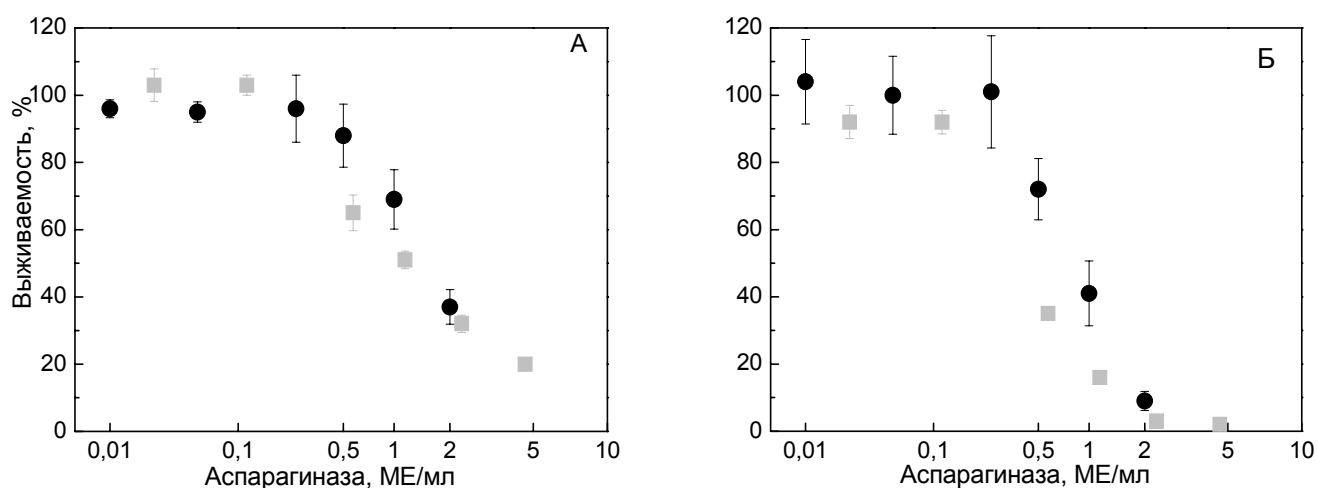


Рис 14. Цитотоксическая активность аспарагиназ НрА(●) и EсА(■) для лимфобластной Т-клеточной лимфомы MOLT-4(A) и лимфомы Беркитта Raji(B).

Морфологические изменения, индуцируемые аспарагиназой НрА в лейкозной клетке, выявляли методом световой микроскопии, а также путем определения конденсации хроматина с использованием флуоресцентного микроскопа после окраски лейкозных клеток Ноеchst. Результаты проведенных нами микроскопических исследований позволили установить, что аспарагиназа НрА ин-

дуцирует апоптоз лейкозной клетки. Эти результаты находятся в соответствии с установленным механизмом гибели лейкозных клеток под действием аспарагиназы.

Перекрестная антигенность НрА и ЕсА. На заключительном этапе работы был проведен сравнительный анализ иммуногенности аспарагиназ НрА и ЕсА. Перекрестную антигенность аспарагиназ НрА и ЕсА определяли методом ИФА с использованием мышинных поликлональных антител. Результаты эксперимента показали, что сыворотка, полученная, например, к одной из аспарагиназ слабо реагировала с другим, иммобилизованным на планшет, ферментом (рис. 15). Так в случае, когда на планшет была нанесена НрА отношение титров антисывороток НрА/ЕсА равнялось 160, а при иммобилизации на планшет ЕсА отношение титров антисывороток ЕсА/НрА – 200. Низкая перекрестная антигенность аспарагиназ НрА и ЕсА позволяет предположить, что НрА может использоваться как препарат для заместительной терапии при развитии гиперчувствительности к ЕсА.

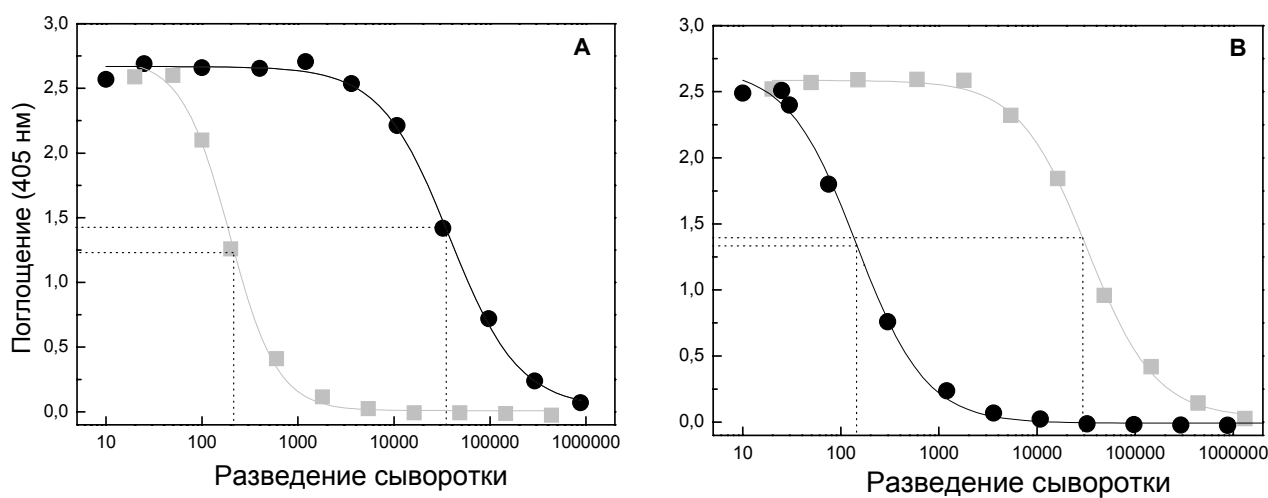


Рис.15. Перекрестная антигенность НрА и ЕсА. ИФА с использованием мышинной поликлональной сыворотки, полученной для НрА (●) и ЕсА (■). НрА иммобилизована на планшет (А); ЕсА иммобилизована на планшет (В).

ВЫВОДЫ

1. Клонирован ген периплазматической аспарагиназы из штамма *H. pylori*. Получен рекомбинантный штамм *E.coli*, устойчиво продуцирующий каталитически активную НрА.

2. Разработана лабораторная процедура очистки НрА, которая является пригодной для промышленного крупномасштабного получения рекомбинантной аспарагиназы и обеспечивает выход активного фермента более 60%.

3. Проведена характеристика терапевтически значимых физико-химических и каталитических свойств НрА. Фермент имеет широкий оптимум рН и характеризуется высокой стабильностью при денатурирующих условиях. Удельная аспарагиназная активность при физиологических условиях составляет 94 МЕ/мг, что значительно превышает глутаминазную активность 0,0083 МЕ/мг.

4. Установлено, что НрА эффективно подавляет рост клеток острой лимфобластной лейкемии MOLT-4, лимфомы Беркита Raji и хронического миелоидного лейкоза K562. Определены соответствующие значения LC₅₀. Показано, что НрА вызывает гибель лейкозной клетки по механизму апоптоза.

5. Показано, что антигенность НрА отличается от антигенности основной терапевтической аспарагиназы из штамма *E.coli*.

Список опубликованных работ по теме диссертации.

1. Гладилина Ю.А., Соколов Н.Н., Красоткина Ю.В. Клонирование, экспрессия и выделение L-аспарагиназы *Helicobacter pylori*.//Биомедицинская химия. – 2008.-Т.54. №4- С.482-486.

2. Красоткина Ю.В., Посыпанова Г.А., Гладилина Ю.А., Борисова А.А., Гервазиев Ю.В., Занин В.А., Соколов Н.Н. Кинетические свойства и цитотоксическая активность рекомбинантной аспарагиназы *Pectobacterium atrosepticum*.// Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2008.-№3- С.18-21.

3. Гладилина Ю.А., Соколов Н.Н., Красоткина Ю.В. Оптимизация экспрессии рекомбинантной L-аспарагиназы *Helicobacter pylori*. // Материалы IV международной научно-практической конференции «Динамика исследований» - г. София, Болгария. – 2008. – С.38-42.

4. Красоткина Ю.В., Леонова Ю.А. Выделение и очистка рекомбинантной аспарагиназы НрА.. // Сборник докладов научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» - г. Волгоград. - 2007.- С.25-26.

5. Леонова Ю.А., Соколов Н.Н., Красоткина Ю.В. Клонирование рекомбинантной аспарагиназы *Helicobacter pylori* J99. // Сборник трудов XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые в медицине» - г. Казань - 2007.- С.259.

6. Леонова Ю.А., Кучумова Н.В., Красоткина Ю.В. Одностадийное выделение и кинетические свойства рекомбинантной аспарагиназы *Erwinia carotovora*. // Сборник докладов международного конгресса «ПЕРСПЕКТИВА- 2007», секция «Биология»– г. Нальчик. - 2007. – С. 37-39.

7. Леонова Ю.А., Соколов Н.Н., Красоткина Ю.В. Клонирование рекомбинантной аспарагиназы *Helicobacter pylori* // Материалы IV Международной научной конференции «Перспективы современной медицинской науки» - г. Винница, Украина. – 2007. – С.167.