

УДК 577.150

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ

Yersinia pseudotuberculosis

© 2013 г. В. С. Покровский*, М. В. Покровская*, С. С. Александрова*, Р. М. Андрианов**, Д. Д. Жданов*, Н. М. Омелянюк*, Е. М. Трещалина***, Н. Н. Соколов*

* Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, Москва, 119121
e-mail: vadimpokrovsky@yandex.ru

** Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071

*** Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАН, Москва, 115478

Поступила в редакцию 3.10.2011 г.

Изучены физико-химические, каталитические свойства, а также антипролиферативная активность рекомбинантной L-аспарагиназы *Yersinia pseudotuberculosis* (YpA). Получены следующие результаты: K_M для L-аспарагина 17 ± 0.9 мкМ, оптимальная температура 60°C , pH 8.0, pI 5.4 ± 0.3 , L-глутаминовая активность не более 5–6% от L-аспарагиназной, антипролиферативная активность на лимфаденозе Фишера L5178y составляет T/C = 136% ($p < 0.001$) при 15% излечения. Описанная характеристика позволяет считать YpA противоопухолевым ферментом с близкими L-аспарагиназе *E. coli* (EcA) биологическими свойствами.

DOI: 10.7868/S0555109913010169

L-аспарагиназа (L-аспарагин амидогидролаза, КФ 3.5.1.1.) катализирует расщепление L-аспарагина с образованием L-аспарагиновой кислоты и аммиака. L-аспарагиназу *E. coli* (EcA) включают в схемы стандартной индукционной терапии острого лимфобластного лейкоза, лимфогранулематоза, множественной миеломы, НК/Т-клеточной и кожной Т-клеточной лимфомы [1–6]. Однако клиническое применение EcA лимитировано выраженными побочными эффектами: аллергические реакции, нарушения функций печени и поджелудочной железы, а также формирование резистентности при длительном лечении. Считается, что побочные эффекты отчасти связаны с L-глутаминовой активностью фермента, поэтому поиск новых менее токсичных L-аспарагиназ целесообразен среди ферментов с низкой L-глутаминовой активностью и высокой активностью при физиологических условиях [7]. Одним из таких ферментов является L-аспарагиназа *Yersinia pseudotuberculosis* (YpA), филогенетически близкая к EcA [8].

Ранее нами был получен продуцент рекомбинантной YpA (штамм *E. coli* BL21(DE3)/pBad24/YERS), которая показала значимую цитотоксичность на культурах клеток различных опухолей человека: Т-лимфобластного лейкоза MOLT-4 и Jurkat, аденокарциномы молочной железы MCF-7, невриномы Гассерова узла крысы НГУК-1 и карциномы простаты человека LnCap [9, 10].

Цель работы – изучение физико-химических и каталитических свойств, а также первичная оценка антипролиферативной активности рекомбинантной YpA in vivo.

МЕТОДИКА

Реактивы. L-аспарагин (“Reanal”, Венгрия), глицин, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KCl (“Serva”, Германия), реактив Несслера, ТХУ, бакто-триптон, бакто-дрожжевой экстракт (“Fluka”, Швейцария); NaOH, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (“Merck”, Германия); TRIS (“BIO-Rad”, США); HCl, CH_3COOH , CH_3COONa (“Реахим”, Россия).

Рекомбинантный штамм-продуцент и его культивирование. В работе использован штамм-реципиент: *E. coli* BL21 (DE3) [F⁻, ompT, hsdSB, (rB⁻, mB⁻), dcm, gal, λ (DE3)] (Центр “Биоинженерия” РАН). Трансформированный штамм *E. coli* BL21(DE3)/pBad24/YERS культивировали в колбах Эрленмейера объемом 1 л в 200 мл среды LB при 37°C на качалке при скорости перемешивания 200 об/мин [10]. Для индукции экспрессии в середине логарифмической фазы роста (оптическая плотность (ОП) 1.5–1.6) вносили арабинозу до конечной концентрации 0.001 М. Выделение и очистку YpA проводили по отработанному ранее методу, степень очистки целевого фермента 93% [10].

Масс-спектрометрический анализ YpA. Проводили на MALDI-TOF масс-спектрометре Bruker

Reflex III ("Bruker Daltonics", Германия) с УФ-лазером (337 нм) в линейном режиме, регистрируя положительный ионы в диапазоне масс 2.7–80 кДа.

Изоэлектрическая точка. Определение проводили путем изоэлектрофокусирования на колонке фирмы "LKB" (Германия) при pH 4.0–10.0 [11].

Определение ферментативной активности. Активность фермента определяли с помощью реактива Несслера [12, 13]. За единицу активности L-аспарагиназы (МЕ) принимали количество фермента, которое высвобождает 1 мкмоль аммиака за 1 мин при 37°C. Глутаминазную активность оценивали аналогичным образом, используя в качестве субстрата L-глутамин. Зависимость активности от pH изучали при 37°C и pH 3.0–11.0 в стандартных буферных растворах: натрий-ацетатный (pH 3.0–6.0), натрий-фосфатный (pH 6.0–8.0), TRIS-HCl (pH 7.0–9.0) и боратный (pH 9.0–11.0) [14]. Влияние температуры на активность изучали в диапазоне 30–80°C. Зависимость удельной активности YpA от ионной силы определяли, изменяя концентрацию KCl от 100 до 3000 мМ. В качестве контроля для всех экспериментов использовали препарат L-аспарагиназы *E. coli* ("Medak", Германия).

Кинетические параметры ферментов. Определение константы Михаэлиса (K_M) проводили по скорости образования аммиака при ферментативном гидролизе L-аспарагина и L-глутамина, аспарагиназную активность оценивали в термостабилизированной при 37°C ячейке, pH 8.0. Аликвоту 1 мл раствора субстрата аспарагина (0.01–0.04 М) смешивали с 0.2 мл 12.5 мМ боратного буфера, затем вносили 0.1 мл раствора ЕсА или YpA (0.5–10 мг/мл). Реакцию останавливали, добавляя 0.6 мл 10%-ного раствора ТХУ. Измерение аммиака проводили с использованием реактива Несслера. Величину поглощения определяли при длине волны 480 нм. Графическую обработку полученных данных и расчет K_M и максимальной скорости реакции (V_{\max}) проводили при помощи программы *Microsoft Excel* по методу двойных обратных величин Лайнуивера–Берка.

Температурная и химическая денатурация. Стабильность YpA и ЕсА изучали при инкубировании в фосфатном буфере в течение 3 мин при различных температурах (до 80°C), а также в течение 1 ч в присутствии 0–8.0 М мочевины, после чего оценивали ферментативную активность стандартным способом [12, 13]. За 100% принимали активность фермента, определяющуюся при 37°C или в отсутствие мочевины.

Антипролиферативная активность in vivo. Использованы мыши-самки DBA₂ массой тела 18–24 г. Перед лечением животных распределяли на группы: опытная ($n = 13$) и контрольная ($n = 11$). Для выявления антипролиферативного действия YpA была использована сигнальная для L-аспарагиназ

модель in vivo – лимфаденоз Фишера L5178y [15]. Штамм L5178y получен из Банка опухолевых штаммов Российского онкологического центра им. Н.Н. Блохина, в опытах использован 3 пассаж in vivo. Клетки L5178y трансплантировали внутривентриально (в/б) по стандартной методике [16]. Инъекционный раствор YpA в концентрации 50 МЕ/мл вводили мышам в/б в разовой дозе 1000 МЕ/кг 10-кратно с интервалом 24 ч, суммарная доза составила 10000 МЕ/кг. Лечение начинали через 24 ч после трансплантации опухоли. Животным в контрольной группе вводили по 0.3 мл растворителя в аналогичном режиме. Эффективность лечения оценивали по увеличению продолжительности жизни в сравнении с контрольной группой, для чего определяли среднюю продолжительность жизни (СПЖ) в обеих группах и рассчитывали отношения показателей опытной группы к контрольной, Т/С, %, в контрольной группе Т/С = 100%. Мышей, проживших более 60 сут без признаков опухолевого процесса на вскрытии (асцит, узловой рост, поражение брыжеечных лимфатических узлов), считали излеченными [16]. При расчете СПЖ излеченных мышей не учитывали. Статистическую обработку выживаемости мышей проводили с использованием логарифмического рангового критерия и построением кривых Каплана–Майера. Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Химическая структура. YpA состоит из 345 аминокислотных остатков. Анализ аминокислотной последовательности YpA с помощью программы CLUSTAL 2.0.10 показал 99% идентичность с L-аспарагиназой *Yersinia pestis* (Q1CGG1, Q1CA77, A6BSN7 и др.). В ряду применяемых в клинической онкологии L-аспарагиназ YpA наиболее гомологична периплазматической ЕсА (B7MZQ6, B7U104-1). Аминокислотные последовательности указанных ферментов идентичны на 74%, причем N-концевые участки более близки, чем C-концевые (рис. 1). По данным масс-спектрометрии молекулярная масса мономера YpA сопоставима с массой ЕсА и составляет 36.5 кДа [17].

Изоэлектрическая точка. Изоэлектрическая точка YpA находится при pH 5.4 ± 0.3 и лежит примерно в той же кислой зоне pH, как и у ЕсА [13]. Этот результат соответствует теоретическому значению.

Зависимость активности от pH, температуры и ионной силы. YpA, аналогично ЕсА, каталитически активна в широком диапазоне pH независимо от состава буферного раствора. Максимальная активность отмечена при pH 8.0. При понижении pH до 7.4 активность YpA сохраняется на достаточно высоком уровне $\geq 96\%$. Увеличение pH до 10.0 приводило к снижению активности YpA, но

УрА	MKYIKLTVLAGIFVGISSPVFALPNITLLATGGTIAGGGDSATKSNYTAGKLGVDA	56
ЕсА	MEFFKKTALAALVMGFSGAALALPNITILATGGTIAGGGDSATKSNYTVGKVGVEN	56
	LVEAVPAIKDIANIQGEQVVNIGSQDMNDDVWLTLLAKKINKDCTKTDGFFVITHGTDTL	114
	LVNAVPLKDIANVKGEQVVNIGSQDMNNDVWLTLLAKKINTDCDKTDGFFVITHGTDTM	114
	EETAYFLDLTVNCDKPVVIVGAMRPATALGADGPLNLYNAVVAEADSAKRGVLVAMND	174
	EETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSMSADGPFNLYNAVVTAAADKASANRGVLVVMND	174
	MVFTGRDVVKTNTTSVQTFQSPNTGPLGYIYDGKVNLYHQPAARQP---AFDISKLNTL	230
	TVLDGRDVTKTNTTDVATFKSVNYGPLGYIHNGKIDYQRTPARKHTSDTFFDVSKLNEL	233
	PKVGI IYNYANASDI PAKALIADGYQGIVSAGVGNGLYHTVFDTLATAASHGVAVVRSS	290
	PKVGI VYNYANASDL PAKALVDAGYDGIVSAGVGNGLYKSVFDTLATAAKTGTAVVRSS	293
	RVPSGSTTEGAEIDDAKYGFVAAGALNPQKARVLLQLALTQTQKPQEIQKLFHTY	345
	RVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLNPQKARVLLQLALTQTQKDPQIQIIFNQY	348

Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей УрА и ЕсА (CLUSTAL 2.0.10). Выделен основной антигенный эпитоп ЕсА.

не такому существенному, как для ЕсА. Таким образом, в отличие от ЕсА, оптимум pH УрА находится в более щелочной области, однако выявленные различия незначительны (рис. 2).

Температурный оптимум действия отмечался при 55–60°C. При 36–37°C активность фермента составляла около 60–70% от максимальной. Зависимость активности УрА от температуры сопоставима с аналогичными характеристиками ЕсА. Увеличение активности ферментов при повышении температуры вызвано снижением энергии активации реакции, а последующее падение связано с тепловой денатурацией белка [18]. Изменение ионной силы в присутствии 100–3000 мМ KCl практически не влияет на активность УрА.

Стабильность фермента. При инкубировании УрА при нормальной температуре тела человека (37°), комнатной температуре (24°C), а также при 4°C L-аспарагиназная активность сохранялась на

уровне $\geq 95\%$ от начальной в течение 3 сут. В диапазоне от -70 до -20°C в буфере (10 мМ K_2HPO_4 , 10 мМ KH_2PO_4 , 1 М глицин, 1 мМ ЭДТА, 0.28 М KCl и 0.5% глюкозы) активность УрА не снижалась в течение 12 мес. При инкубировании при 60°C через 3 мин сохранялось всего 15% активности УрА, а через 5 мин – только 6% (рис. 3). Инкубирование при 80°C в течение 10 мин приводило почти к полной потере активности, оставалось менее 1% от исходной.

Инкубирование УрА и ЕсА в течение 1 ч с 0–4 М мочевиной продемонстрировало устойчивость обоих ферментов (сохраняется не менее 80% активности). При дальнейшем увеличении концентрации мочевины активность начинала постепенно снижаться, в присутствии 8 М мочевины активность – $\geq 40\%$.

Кинетические свойства. Для УрА характерна гиперболическая зависимость скорости гидролиза

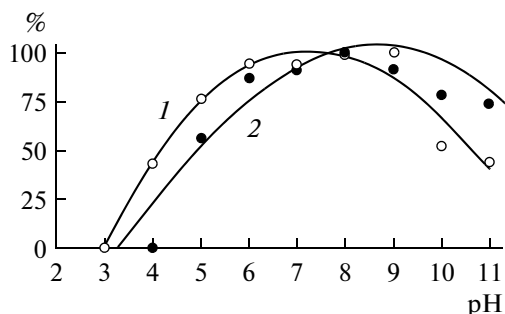


Рис. 2. Зависимость активности (%) от pH. 1 – УрА, 2 – ЕсА.

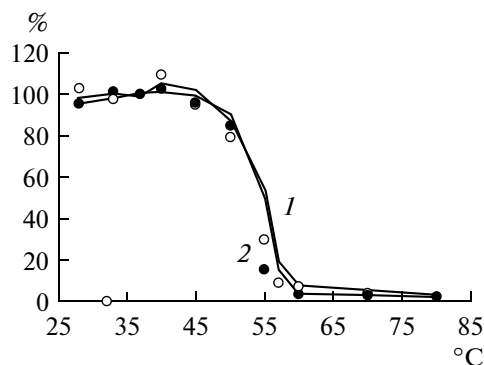


Рис. 3. Активность (%) УрА (1) и ЕсА (2) после инкубирования в течение 3 мин при различных температурах.

L-аспарагина и L-глутамин. K_M для Υ рА в отношении L-аспарагина составила 17 мкМ, $V_{\text{макс}}$ 4.8 мМ/мин (при концентрации фермента в реакционной смеси 21 мкМ), $K_{\text{кат}} = 0.22 \text{ с}^{-1}$. Измеренная аналогичным образом K_M для ЕсА составила также 17 мкМ, что соответствовало полученным ранее данным [19]. L-глутаминовая активность, определенная с использованием реактива Несслера, не превышала 6% от L-аспарагиназной, что соответствует аналогичным параметрам для ЕсА.

Антипролиферативная активность. Показано, что при 10-кратном курсе лечения в разовой дозе 1000 МЕ/кг Υ рА продлевает СПЖ мышей в сравнении с группой контроля: 23.7 ± 3.1 и 17.5 ± 1.8 сут соответственно, $T/C = 136\%$ ($p < 0.001$). Излеченными в опытной группе оказались 2 мыши, что составило 15%, в группе контроля случаев спонтанного рассасывания не наблюдали. Кривые выживаемости по Каплану–Майеру представлены на рис. 4. При вскрытии излеченных мышей на 60 сут опыта признаков опухолевого процесса не отмечено. Переносимость лечения была удовлетворительной, гибели мышей от токсичности не отмечали.

Таким образом, в работе показано, что Υ рА по основным физико-химическим и кинетическим параметрам близка ЕсА и проявляет достоверную антипролиферативную активность *in vivo*. Сравнительные физико-химические характеристики Υ рА и ЕсА, обобщенные в таблице, показывают сходные значения оптимумов рН, изоэлектрических точек и кинетических констант для L-аспарагина, что соответствует данным о 74% гомологичности аминокислотных последовательностей. Основные активные центры Υ рА и ЕсА совпадают: взаимодействующие с NH_2 -группой и карбоксильными группами субстрата Три¹², Гли⁵⁹, Сер⁵⁸, Три⁸⁹, Асп⁹⁰, Ала¹¹⁴, Глу²⁸³; непосредственно участвующий в катализе Тир²⁵; важные для стабилизации нативного тетрамера ЕсА Тир¹⁸¹ и Тир³²⁶, а

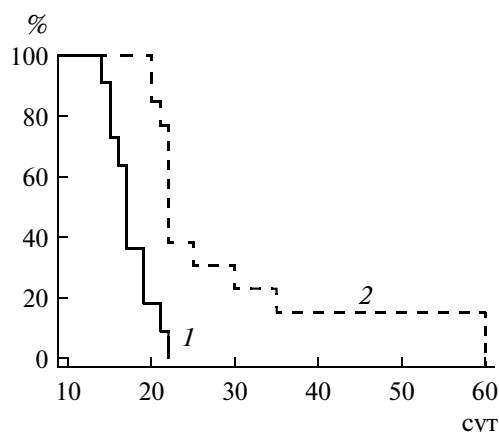


Рис. 4. Антипролиферативный эффект (выживаемость, %) на модели лимфаденоза Фишера L5178у. 1 – контроль, 2 – Υ рА.

также Асн²⁴⁸, отвечающий за L-глутаминовую активность ЕсА и образующий водородную связь с остатком Асп⁹⁰ [19–21]. В то же время один из установленных [22] основных антигенных эпитопов ЕсА (¹⁹⁵RKH¹⁹⁷) у Υ рА не дублируется. Следовательно, несмотря на близкие структуры активного центра и схожие молекулярные механизмы действия, у Υ рА можно предположить иные антигенные свойства.

Полученная характеристика Υ рА свидетельствует о близких к ЕсА физико-химических свойствах (K_M для L-аспарагина Υ рА 17 ± 0.9 мкМ; оптимальная температура 60°C и рН 8.0, сопоставимая L-глутаминовая активность) и значимой антипролиферативной активности ($T/C = 136\%$, 15% излечения) в невысокой суммарной терапевтической дозе 10000 МЕ/кг. Полученные результаты позволяют считать Υ рА противоопухолевым ферментом с близкими ЕсА биологическими свойствами. Для подтверждения преимуществ Υ рА перед L-аспарагиназой *E. coli* целесообразно

Физико-химические свойства и равновесные кинетические параметры Υ рА и ЕсА

Параметр	Υ рА	ЕсА
Молекулярная масса мономера, кДа	36.27	36.85
Число аминокислотных остатков	345	348
Оптимум рН	8.0–8.5	7.0–7.5
pI	5.4 ± 0.3	5.0 ± 0.2
K_M для L-аспарагина, мкМ	17 ± 0.9	17 ± 0.9
L-глутаминовая активность, % от L-аспарагиназной	5.7	≈5

подробное изучение особенностей противоопухолевого действия и оценка перекрестной антигенности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Capizzi R.L. // *Leuk. Lymphoma*. 1993. № 10. P. 147–150.
2. Jaccard A., Petit B., Girault S., Suarez F., Gressin R., Zini J.M., Coiteux V., Larroche C., Devidas A., Thiéblemont C., Gaulard P., Marin B., Gachard N., Bordessoule D., Hermine O. // *Ann. Oncol.* 2009. V. 20. № 1. P. 110–116.
3. Yong W., Zheng W., Zhang Y., Zhu J., Wei Y., Zhu D., Li J. // *Int. J. Hematol.* 2003. V. 78. № 2. P. 163–167.
4. Obata K., Tara M., Niina K. // *Int. J. Hematol.* 1999. V. 69. № 4. P. 260–262.
5. Agrawal N.R., Bukowski R.M., Rybicki L.A., Kurtzberg J., Cohen L.J., Hussein M.A. // *Cancer*. 2003. V. 98. № 1. P. 94–99.
6. Kobrinsky 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. // *J. Clin. Oncol.* 2001. V. 19. № 9. P. 2390–2396.
7. Reinert R.B., Oberle L.M., Wek S.A., Bunpo P., Wang X.P., Mileva I., Goodwin L.O., Aldrich C.J., Durden D.L., McNurlan M.A., Wek R.C., Anthony T.G. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 42. P. 31222–31233.
8. Borek D., Jaskólski M. // *Acta Biochim. Pol.* 2001. V. 48. № 4. P. 893–902.
9. Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Борисова А.А., Сидорук К.В., Александрова С.С., Омелянюк Н.М., Покровская М.В., Кондакова Л.И., Соколов Н.Н. // *Биомед. химия*. 2008. Т. 54. № 6. С. 712–719.
10. Сидорук К.В., Покровский В.С., Борисова А.А., Омелянюк Н.М., Александрова С.С., Покровская М.В., Гладилина Ю.А., Богуш В.Г., Соколов Н.Н. // *Бюлл. эксперим. биол. мед.* 2011. Т. 152. № 8. С. 179–183.
11. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами, М.: Наука, 1983. 304 с.
12. Wriston J.C., Yellin T.O. // *Adv. Enzymol.* 1985. V. 39. P. 185–248.
13. Wade H.E., Philips B.P. // *Anal. Biochem.* 1971. V. 44. P. 189–199.
14. Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. С. 354–369.
15. Трещалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. М.: Практическая медицина, 2005. 270 с.
16. Chabner B.A., Longo D.L. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001, P. 678–699.
17. Whelan H.A., Wriston J.C. // *Biochemistry*. 1969. V. 8. № 6. P. 2386–2393.
18. Peng G., Fritsch G., Zickermann V., Schägger H., Mentele R., Lottspeich F., Bostina M., Radermacher M., Huber R., Stetter K.O., Michel H. // *Biochemistry*. 2003. V. 42. № 10. P. 3032–3039.
19. Derst C., Henseling J., Röhm K.H. // *Protein Sci.* 2000. V. 9. № 10. P. 2009–2017.
20. Lubkowski J., Wlodawer A., Ammon H.L., Copeland T.D., Swain A.L. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. № 34. P. 10257–10265.
21. Derst C., Henseling J., Röhm K.H. // *Protein Eng.* 1992. V. 5. № 8. P. 785–789.
22. Jianhua C., Yujun W., Ruibo J., Min W., Wutong W. // *Mol. Biotechnol.* 2006. V. 33. № 1. P. 57–65.

Physicochemical Properties and Antiproliferative Activity of Recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-Asparaginase

V. S. Pokrovskii^a, M. V. Pokrovskaya^a, S. S. Aleksandrova^a, R. M. Anriyanov^b, D. D. Zhdanov^a, N. M. Omel'yanyuk^a, E. M. Treshchalina^c, and N. N. Sokolov^a

^a Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul. 10, Moscow, 119832 Russia

^b Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 119071 Russia

^c Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoe sh. 24, Moscow, 115478 Russia

Received October 3, 2011

Abstract—The physicochemical, catalytic, and antiproliferative activity of a recombinant L-asparaginase from *Yersinia pseudotuberculosis* (YpA) have been studied. The following results were obtained: the K_M value for L-asparagine is $17 \pm 0.9 \mu\text{M}$, the optimal temperature is 60°C , pH is 8.0, pI is 5.4 ± 0.3 , the L-glutaminase activity is no more than 5–6% of the L-asparaginase activity, and the antiproliferative activity on the Fisher L5178y lymphadenosis cell line comprised T/C = 136% ($p < 0.001$) at a 15% recovery rate. The described characteristic allows one to regard YpA as an antitumor enzyme with biological features similar to the L-asparaginase of *E. coli*.