

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 617:577.382

©Коллектив авторов

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ *ERWINIA CAROTOVORA*, ЭКСПРЕССИРОВАННОЙ В КЛЕТКАХ *E. COLI*

А.А. Борисова¹, М.А. Эльдаров², А.А. Жгун², С.С. Александрова¹,
Н.М. Омелянюк¹, Б.Н. Соков¹, Т.Т. Березов¹, Н.Н. Соколов¹

¹Государственное учреждение Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии им.В.Н.Ореховича РАМН, 119121, г. Москва,
Погодинская ул., 10; тел./факс (095)246-33-80/(095)245-08-57;
эл.почта: sokolov@ibmh.msk.su

²ГУ Центр "Биоинженерия" РАН, 117312, г. Москва, Проспект 60-летия Октября, 7/1.

³Научно-исследовательский центр токсикологии биопрепаратов МЗ РФ, 142253,
Московская область, г. Серпухов, ул. Ленина, 102А.

⁴Российский Университет Дружбы народов, 117198, Москва,
ул. Миклухо-Маклая, 6.

Разработан метод выделения и очистки экспрессированной в клетках *E.coli* рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*, включающий ультразвуковую дезинтеграцию клеток, фракционирование сульфатом аммония и хроматографию на колонке с катионообменниками CM- или SP-Сефарозой. Получен гомогенный, по данным электрофореза в ПААГ-ДСН*, препарат фермента с удельной активностью около 620 МЕ/мг белка и выходом 75%. По своим физико-химическим и структурным свойствам рекомбинантная L-аспарагиназа сходна с ферментами из диких штаммов *Erwinia carotovora* и рекомбинантной L-аспарагиназой наиболее близкого родственного микроорганизма *Erwinia chrysanthemi*.

Ключевые слова: L-аспарагиназа, лимфолейкозы, рекомбинантные белки, *Erwinia carotovora*, *E.coli*.

ВВЕДЕНИЕ. На сегодняшний день единственным примером практического использования ферментов в онкологии является широкое применение L-аспарагиназ из штаммов *E.coli* и *Erwinia carotovora* для лечения острых лимфобластных лимфолейкозов, лимфо- и ретикулобластом [1,2]. L-Аспарагиназа (L-аспарагин-амидогидролаза; КФ 3.5.1.1.), относящаяся к треониновым амидогидролазам, катализирует гидролитическое расщепление L-аспарагина с образованием L-аспарагиновой кислоты и аммиака. Интерес к этому ферменту возник около 40 лет тому назад, после того как было доказано, что за противоопухолевую активность сыворотки крови морской свинки ответственна

*Принятые сокращения: ПААГ-ДСН - полиакриламидный гель с добавлением додецилсульфата натрия, ОЕ - оптическая единица, ИЭТ - изоэлектрическая точка.

именно L-аспарагиназа [3]. В основе механизма противоопухолевого действия фермента лежит вызываемое им уменьшение в тканях концентрации L-аспарагина, что приводит к ослаблению или прекращению синтеза белка в опухолевых клетках, и в конечном счете к регрессии опухоли [4]. Процедуры выделения L-аспарагиназы детально описаны для различных бактериальных ферментов [5]. Первоначальные методы очистки L-аспарагиназы отличались многостадийностью (термообработка, фракционирование сульфатом аммония и органическими растворителями, хроматография на различных обменниках) [5,6-8]. Появление новых видов сорбентов, особенно аффинных и иммуносорбентов, а также создание генно-инженерных штаммов-суперпродуцентов позволило значительно упростить процедуру выделения фермента [9-12]. Цель исследования состояла в разработке способа выделения и очистки рекомбинантной L-аспарагиназы *Erw. carotovora*, экспрессированной в клетках *E. coli*, и изучении некоторых свойств фермента.

МЕТОДИКА. *Использованные штаммы микроорганизмов.* Штаммы-суперпродуценты L-аспарагиназы были получены путем трансформации клеток *E. coli* BL-21(DE3) плазмидой pACYC177 ("New England Biolabs", США), в которую был встроен ген L-аспарагиназы *Erw. carotovora* [13].

Микроорганизмы выращивали в ферментере объемом 8 л (LKB 1601 Ultroform "Fermentation System", Швеция) на среде LB с ампициллином (0,1 мМ), pH 7,2-7,4, при температуре 37°C. Аэрацию осуществляли барботированием со скоростью потока воздуха 3,5 л/мин.

Индукция экспрессии L-аспарагиназы. В ферментер вносили посевной материал (ночная культура) в соотношении 1:50 и проводили выращивание до $OD_{600} = 1,5 - 2,0$ ОЕ. Затем в среду добавляли индуктор синтеза L-аспарагиназы изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,1 мМ и продолжали выращивание до $OD_{600} = 4 - 5$ ОЕ.

Определение активности L-аспарагиназы. Активность L-аспарагиназы определяли методом прямой несселеризации [14]. За единицу активности фермента (МЕ - международная единица) принимали такое количество L-аспарагиназы, которое катализирует освобождение 1 мкмоль аммиака за 1 мин при 37°C. Удельную активность выражали в единицах активности L-аспарагиназы в расчете на 1 мг белка, определенного по методу Лоури [15].

Выделение и очистка L-аспарагиназы. (Все операции по выделению проводили при +4°C). Микробную массу *E. coli* собирали центрифугированием (8000 g; 10 мин) и 20 г биомассы суспендировали в 100 мл 10 мМ Na₂ЭДТА, pH 9,5. Ультразвуковую дезинтеграцию клеток осуществляли на дезинтеграторе УЗДН-2Т (СССР) порциями по 50 мл при следующем режиме: 30 с озвучивания, 30 с перерыв. Суммарное время озвучивания составляло 7 мин.

Фракционирование сульфатом аммония. Суспензию клеток после обработки ультразвуком осаждали центрифугированием (15000 g; 60 мин). К супернатанту добавляли при перемешивании на магнитной мешалке кристаллический (NH₄)₂SO₄ до конечной концентрации 20% от насыщения. После полного растворения соли перемешивание продолжали еще 20 мин, и суспензию центрифугировали (20000 g, 30 мин). К супернатанту добавляли сульфат аммония до насыщения 60% и после растворения соли выпавший осадок собирали центрифугированием в том же режиме. Осадок оставляли на ночь при температуре +4°C.

Фракцию белков после осаждения сульфатом аммония на предыдущем этапе растворяли в буфере А (10 мМ K₂HPO₄, 10 мМ KH₂PO₄, 1 мМ глицин, 1 мМ Na₂ЭДТА, pH 5,6). Обессоливание препарата L-аспарагиназы проводили на колонке с сефадексом G-25 (4,5 x 76 см), уравновешенной буфером А. Скорость протекания буфера - 420 мл/час. Фракции, содержащие L-аспарагиназу, объединяли и определяли суммарную активность фермента.

Хроматографию обессоленного белка осуществляли на колонке с SP-сефарозой (3,0 x 8,5 см), уравновешенной буфером А. Скорость нанесения образца и промывки колонки составляла соответственно 1 и 2 мл/мин. Белок

СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ *ERWINIA CAROTOVORA*

элюировали линейным градиентом KCl. L-аспарагиназа элюировалась при концентрации KCl в рабочем буфере 0,3-0,35 М. Фракции, содержащие L-аспарагиназу, объединяли.

Объединенные фракции с SP- или CM-сефарозы помещали в ячейку Amicon объемом 220 мл, содержащую фильтр Millipore (Ultrafiltration membrane D = 63.5 mm, NMWL 30 000) и доводили объем до 200 мл бидистиллированной водой. Концентрирование и обессоливание происходило под давлением, которое создавали с помощью вакуумного насоса Millipore.

Сконцентрированный материал разливали в биовials (объем 4 мл), по 1,0 мл, добавляли раствор глюкозы до конечной концентрации 0,5%, замораживали при -80°C и лиофилизировали в течение ночи. Препарат хранили при -20°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для получения бесклеточного экстракта мы использовали ультразвуковую дезинтеграцию клеток. При соблюдении условий, описанных в "Методике", обработка клеток ультразвуком позволяла полностью их разрушить. При последующем центрифугировании, вероятно, вследствие адсорбции L-аспарагиназы осадком разрушенных клеток, терялось 10-20% активности, однако, на этой стадии происходило удаление почти 50% балластного материала. Далее были подобраны условия фракционирования бесклеточного экстракта сульфатом аммония. Установлено, что для экстракта из клеток *E.coli/pACYC177* зона осаждения L-аспарагиназы находилась в интервале насыщения сульфатом аммония 20-60%. Как видно из таблицы, при последующем обессоливании сульфат-аммонийной фракции на колонке с сефадексом G-25, потери активности фермента составляли всего 2-9%, а в целом на этой стадии очистки удалось освободиться от 30% балластных белков.

Таблица. Очистка L-аспарагиназы из *E.coli/pACYC177*

Этап очистки	Общий белок (мг)	Активность аспарагиназы		Выход, (%)	Степень очистки (раз)
		Общая (МЕ)	Удельная (МЕ/мг)		
Суспензия клеток	2131	107 000	50,2	100	1
Бесклеточный экстракт	1140	85 600	75,1	80	1,5
Сульфат-аммонийная фракция (20-60%)	824	83 460	101,3	78	2,02
Хроматография на SP-сефарозе FF	132	81 320	589	76	11,73
Концентрирование и лиофилизация	130	80 250	617	75	12,29

Завершающая стадия очистки рекомбинантной L-аспарагиназы заключалась в хроматографии обессоленного материала на колонке с SP-сефарозой FF. Далее препарат фермента обессоливали и лиофилизировали, при этом были подобраны оптимальные условия лиофильного высушивания. Известно, что для повышения стабильности L-аспарагиназы при хранении к препарату добавляют различные сахара [16]. Мы лиофилизировали фермент в присутствии ряда сахаров (глюкоза, маннит или сорбит). Установлено, что 100%-ное сохранение активности в процессе лиофилизации достигается при использовании глюкозы, маннита (0,1%) и смеси сорбитола и NaCl (соответственно 0,5% и 10 мМ). Однако в процессе хранения при -20°C наиболее стабильным оказался препарат фермента, стабилизированный добавлением 0,5% глюкозы. При хранении в течение 1 месяца лиофилизированного препарата L-аспарагиназы при -20°C активность фермента практически не изменялась. Через 6 месяцев хранения препарат сохранял 50% исходной активности.

Из данных таблицы видно, что на стадии хроматографии на SP-сефарозе FF потеря ферментативной активности не происходило, в то время как удельная

активность L-аспарагиназы возрастала до 600 ME/мг белка, что свидетельствует о высокой степени очистки фермента и хорошо согласуется с данными литературы для L-аспарагиназы из диких штаммов *Erw. carotovora* [9,17] и рекомбинантного фермента *Erw. chrysanthemi* [11,18]. На заключительном этапе выделения выход L-аспарагиназы составил 75%, что позволяет получить с 1 л культуральной жидкости около 70 мг очищенного фермента (или примерно 43 000 ME активности). Результаты хроматографии сульфат-аммонийной фракции на другом катионообменнике CM-сефарозе FF были аналогичны выпущенным для SP-сефарозы FF.

Анализ белка в ПААГ/ДСН (рис. 1) выявил наличие одной белковой зоны с молекулярной массой около 36 кДа, что соответствует таковой субъединицы L-аспарагиназы дикого штамма *Erw. carotovora* [9,17,19].

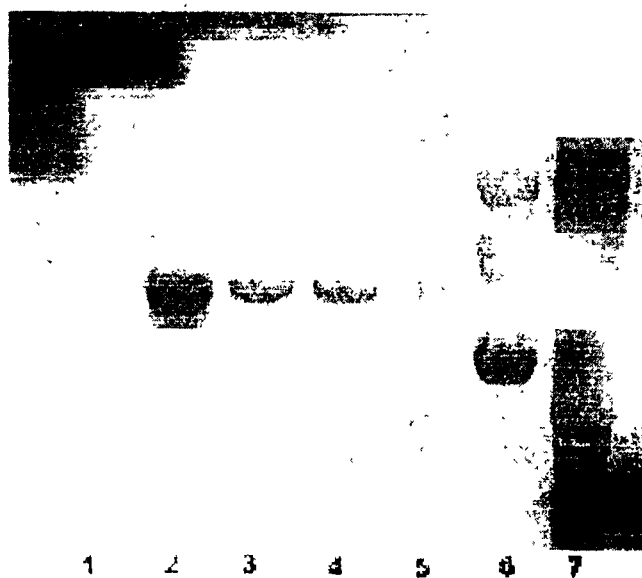


Рисунок.

Электрофоретическое разделение в ПААГ/ДСН (12,5%) препаратов L-аспарагиназы на разных этапах очистки. 1 - аспарагиназа *Erw. chrysanthemi* (Sigma); 2 - маркер мол. массы 36 кДа; 3 и 4 - фракции соответственно после CM- и SP-сефарозы FF; 5 - фракция после гель-фильтрации на сефадексе G-25; 6 - стандарты белков (29, 45 и 66 кДа); 7 - бесклеточный экстракт.

При изоэлектрофокусировании препарата на колонке с амфолинами [20] в интервале значений pH 4-10 и 7-9 было установлено, что изоэлектрическая точка рекомбинантной L-аспарагиназы находится при $\text{pH } 8,1 \pm 0,05$, что примерно соответствует значению ИЭТ фермента из природного штамма *Erw. carotovora* [5]. Оптимум pH действия L-аспарагиназы, определенный в калий-фосфатном, боратном и трис-HCl буферных растворах, находится в интервале значений pH от 7,5 до 9,0, при этом ферментативная активность не зависит от использованного буфера. Рекомбинантная L-аспарагиназа гомогенна по N-концу и имеет N-концевую аминокислотную последовательность A E N L P N I V I L, полностью совпадающую с таковой для фермента из дикого штамма *Erw. carotovora* [17]. Коэффициент молярной экстинкции (поглощение 1%-ного раствора фермента при 278 нм в кювете с длиной оптического пути = 1 см) гомогенного рекомбинантного белка, оказался равным около 6,7. Для L-аспарагиназы из дикого штамма *Erw. carotovora* NCPRB 1066 этот коэффициент составляет $6,1 \pm 0,3$ [19].

Результаты доклинических испытаний рекомбинантной L-аспарагиназы *Erw. carotovora*, проведенные в НИИ токсикологии биопрепаратов МЗ РФ показали, что фермент оказывает выраженный специфический противоопухолевый эффект при

СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ *ERWINIA CAROTOVORA*

введении мышам с перевиваемыми лейкозами, такими как лимфосаркома ЛИО-1 и лимфоаденоз L 5178 Y, и обладает слабыми общетоксическим, иммунотоксическим и сенсибилизирующим действием. Это, а также высокий уровень экспрессии рекомбинантной L-аспарагиназы *Erw. carotovora* в клетках *E. coli*, достигающий 10-15% от тотального растворимого белка клетки, и высокая эффективность разработанного лабораторного способа очистки фермента позволяют надеяться на практическое использование результатов настоящей работы для создания лекарственной формы L-аспарагиназы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Международного Научно-Технического Центра (МНТЦ), проект №1263.

Авторы выражают благодарность В.Г.Богущу и К.В.Сидоруку (ФГУП ГосНИИгенетика), Е.В.Свешниковой (ИМБ РАН) за сотрудничество в создании систем экспрессии рекомбинантной аспарагиназы *Erw. carotovora*, К.Г.Скрябину (ГУ Центр "Биоинженерия" РАН) и А.И.Арчакову (ГУ НИИ БМХ РАМН) за ценные советы и замечания при обсуждении результатов исследования и написании статьи. Авторы благодарны д-ру В.-Н. Шунку ("Max-Delbruck Centre for Molecular Medicine", Berlin, Germany) за помощь в экспериментах по секвенированию белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соколов Н. Н., Занин В. А., Александрова С. С. (2000) *Вопр. мед. химии*, **46**, 531-548.
2. Kantarjian H.M. (1994) *Am. J. Med.*, **97**, 176-184.
3. Broom, J. D. (1961) *Nature* **191**, 1114-1115.
4. Keefer J.F., Moraga D.A., Schuster S.M. (1985) *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 559-565.
5. Wriston J.G. (1985) *Methods Enzymol.*, **113**, 608-618.
6. Мардашев С.Р., Козлов Е.А., Соколов Н.Н., Ковачевич И.В., Горбатенко Л.В. (1972) *Вопр. мед. химии*, **18**, 318-321.
7. Николаев А.Я., Соколов Н.Н., Козлов Е.А., Куцман М.Е. (1975) *Биохимия*, **40**, 984-989.
8. Suck P.W., Elsworth R., Miller G.A., Sargent K., Stanley J.L., Wade H.E. (1971) *J. Gen. Microbiol.*, **65**, i.
9. Lee S.-M., Wroble M.H., Ross J.T. (1989) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **22**, 1-11.
10. Harms F., Wehner A., Jennings M.P., Puch K.J., Beacham I.R., Rohm K.H. (1991) *Protein Expr. Purif.*, **2**, 144-150.
11. Goward C.R., Stevens G.B., Tattersall R., Atkinson T. (1992) *Bioseparation*, **2**, 335-341.
12. Gilbert H.J., Blazek R., Bullman H.M.S., Minton N.P. (1986) *J. Gen. Microbiol.*, **132** (Pt.1), 151-160.
13. Эльдаров М.А., Гервазиев Ю.В., Жгун А.А., Александрова С.С., Омелянюк Н.М., Борисова А.А., Соколов Н.Н. (2001) *Материалы Всероссийской конф. "Биотехнология-2001"*, Пушино, с.229.
14. Wriston J.G., Jr. (1970) *Methods Enzymol.* **17**, 732-742.
15. Lowry O. H., Rosebrough, N. J., Farr A. L., and Randall, R. J. (1951), *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
16. Adams G.D., Ramsay J.R. (1996) *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1301-1305.
17. Lee S.-M., Ross J.T., Gustafson M.E., Wroble M.H., Muschik G.M. (1986) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **12**, 229-246.
18. Goward C.R. Patent USA, №5310670.
19. Cammack K.A., Marlborough D.I., Miller D.S. (1972) *Biochem. J.*, **126**, 361-379.

20. Остерман Л.А. (1983) Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами, "Наука".

Поступила 27.06.2003

PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF RECOMBINANT ERWINIA CAROTOVORA L-ASPARAGINASE, EXPRESSED IN E.COLI CELLS

A.A.Borisova¹, M.A.Eldarov², A.A.Zgon³, S.S.Alexandrova⁴, N.M.Omelyanuk¹, B.N.Sokov¹, T.T.Berezov⁴, N.N.Sokolov¹

¹Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia;
phone/fax: (095)246-33-80/(095)245-08-57; e-mail: sokolov@ibmh.msk.su

²Center of Bioengineering, Russian Academy of Sciences, Prospekt 60-letya Oktyabrya, 7/1,
Moscow, 117312, Russia

³RCT&HRB The Ministry of Health of the Russian Federation, Lenin str., 102A, Serpukhov,
Moscow region, 142253, Russia

⁴Peoples' Friendship University, Miklucho-Maklaya str. 6, Moscow, 117178, Russia

The method of purification *Erwinia carotovora* recombinant L-asparaginase, expressed in *E.coli*, including ultrasonic disintegration of biomass, fractionation ammonium sulfate and column chromatography on CM- or SP-Sepharose has been developed. According to SDS-PAGE the enzyme preparation was homogeneous, its specific activity and yield consist respectively about 620 IU/mg of protein and 75%. Physical-chemical and structural properties of recombinant *Erwinia carotovora* L-asparaginase are similar to the enzymes from the wild strains *Erwinia carotovora* and recombinant L-asparaginase *Erwinia chrysanthemi*.

Key words: L-asparaginase, leukemia, recombinant proteins, *Erwinia carotovora*, *E.coli*.