

УДК: 616-008.939.15-39:616.12-008.61

©Коллектив авторов

КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ И ВЫДЕЛЕНИЕ L-АСПАРАГИНАЗЫ *HELICOBACTER PYLORI*

Ю.А. Гладилина, Н.Н. Соколов, Ю.В. Красоткина

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, РАМН, Москва;
тел./факс: (495) 246-3380; эл.почта: biomed_2005@bk.ru

Клонирован ген периплазматической аспарагиназы из штамма *H. pylori*. Получен рекомбинантный штамм *E. coli*, устойчиво продуцирующий каталитически активную НрА. В результате оптимизации условий культивирования и индукции синтеза белка был достигнут уровень экспрессии рекомбинантного фермента равный 6% от общего белка штамма-продуцента. Разработан одностадийный метод выделения НрА, который обеспечивает выход активного фермента более 60%. Удельная аспарагиназная активность очищенного фермента составляла 92 МЕ/мг белка. Скорость гидролиза глутамина была равна $8,3 \cdot 10^{-3}$ МЕ/мин. Полученные результаты указывают на перспективность создания на основе НрА обладающего низким токсическим эффектом лекарственного препарата для лечения лейкозов.

Ключевые слова: рекомбинантная аспарагиназа, острый лимфобластный лейкоз, *Helicobacter pylori*.

ВВЕДЕНИЕ. Острый лимфобластный лейкоз является самым частым онкологическим заболеванием в педиатрии. На его долю приходится более 30% всех опухолей у детей [1]. Ежегодно в России регистрируют до 3000 новых случаев этого заболевания [2]. Аспарагиназа является одним из основных и незаменимых лекарственных препаратов при лечении лейкоза [3]. Её применяют в фазах индукции и консолидации ремиссии. Однако терапия с использованием аспарагиназы индуцирует широкий спектр функциональных нарушений, включающий в себя поражения печени и поджелудочной железы, панкреатит, тромбозы и эмболии, нейротоксичность и подавление иммунной системы [4]. Основной причиной аспарагиназной токсичности принято считать истощение внеклеточного глутамина вследствие частичной глутаминазной активности фермента [5].

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 специфичность наиболее удачного мутанта ЕсА N248А была снижена в 2 раза по сравнению с ферментом дикого штамма [6]. Однако аспарагиназная активность этого производного ЕсА также была снижена и при физиологических условиях составляла не более 12% от первоначальной. Кроме того, была нарушена термодинамическая стабильность каталитически активной конформации фермента.

Второй подход, который и был реализован в данной работе, состоит в поиске новых аспарагиназ с низкой глутаминазной активностью. Нами было осуществлено клонирование аспарагиназы *Helicobacter pylori* (НрА), которая характеризуется

* - адресат для переписки

крайне низкой глутаминазой активностью. Рекомбинантный фермент был экспрессирован в клетках *E. coli*. Также нами был разработан одностадийный метод выделения НрА, обеспечивающий более чем 60%-ный выход активного фермента. Показано, что соотношение глутаминазой и аспарагиназой активностей НрА не превышает 0,01, что делает этот фермент перспективным кандидатом для разработки противолейкозного препарата с низкой токсичностью.

МЕТОДИКА. Ген аспарагиназы НрА (GeneID: 890242) был амплифицирован с геномной ДНК штамма *H. pylori* (GeneBank ID: AE001439), любезно предоставленной д-ром К.М. Момыналиевым (ЗАО “Пинни”, Россия), методом полимеразно-цепной реакции с использованием праймеров: 5' – CACATATGAGAATGTTTTTGAAATTG-3' (прямой) и TGGAATTCCTTAATACTCTTCAAAC -3' (обратный). Рестрикционные сайты *NdeI* и *EcoRI*, включенные в состав праймеров, выделены подчеркиванием. ПЦР-продукт клонировали в вектор *pGEM-T Easy* (“Promega”, США). Секвенирование ПЦР-продукта показало, что его нуклеотидная последовательность идентична нуклеотидной последовательности гена аспарагиназы НрА. Далее ген НрА переклонировали в плазмиду *pET22b* (“Novagen”) для экспрессии в клетках *E. coli* BL21(DE3). Штамм-продуцент НрА получали кальциевой трансформацией клеток *E. coli* штамма *BL21(DE3)plysE* плазмидой *pET22b/НрА*.

Клетки, полученные из 1 л культуры (~6 г, по влажному весу), суспендировали в дистиллированной воде до общего объема смеси 75 мл и разрушали ультразвуком (дезинтегратор УЗДН-2Т, Россия) в течение 5 мин. Далее рН бесклеточного экстракта доводили 1 М KH_2PO_4 до 5,8 и оставляли при 4°C и непрерывном перемешивании на 30 мин для выпадения в осадок части балластных белков. Растворимую фракцию бесклеточного экстракта получали 30 минутным центрифугированием при 10000 g и наносили на колонку с SP-сефарозой (2,5×10 см), уравновешенную 20 мМ калий-фосфатным буфером, рН 5,8. После нанесения белка SP-сефарозу последовательно промывали колоночным буфером до исчезновения следов белка в элюате. Белок элюировали с колонки 70 мл 20 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,0 при скорости потока 2-2,5 мл/мин. Концентрацию белка в процессе хроматографической стадии очистки контролировали с помощью спектрофотометрической ячейки (“Single path monitor unit UV1”, “Pharmacia”, Швеция) при длине волны 280 нм. Степень очистки L-аспарагиназы оценивали с помощью электрофореза в 12%-ном ДСН-полиакриламидном геле по методу Laemmli. Активность L-аспарагиназы определяли методом прямой несселеризации [7]. За единицу активности L-аспарагиназы принимали количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль аммиака за 1 мин при 37°C. Удельную активность выражали в единицах активности L-аспарагиназы в расчете на 1 мг белка. Концентрацию белка в процессе очистки фермента определяли методом Лоури-Фолина [8], применяя бычий сывороточный альбумин (“Sigma”, США) в качестве стандарта. Концентрацию очищенной аспарагиназы рассчитывали исходя из поглощения её раствора при 280 нм, используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{280}^{0,1\%} = 0,6$ (ProtParam, www.exPASy.org).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Аспарагиназа *H. pylori* была клонирована в виде полноразмерного предшественника фермента. Результирующая плазида *pET22b-НрА* позволила осуществлять синтез НрА под контролем *lac*-оперона и T7 промотора в клетках *E. coli* штамма *BL21(DE3)plysE*, синтезирующих полимеразу фага T7. Оптимизация условий экспрессии НрА позволила установить, что культивирование штамма-продуцента при 37°C в течение 16-18 часов после добавления ИПТГ (0,5 мМ) обеспечивает максимальное накопление фермента в биомассе.

Типичная схема очистки рекомбинантной L-аспарагиназы приведена в таблице. Активность аспарагиназы в бесклеточном экстракте составляла 4-6 МЕ/мг, что указывает на 5-6%-ное содержание аспарагиназы в экстракте от тотального

белка (рисунок). Наибольшие потери фермента происходят на начальной стадии получения бесклеточного экстракта. В работе [9] использовали обработку биомассы ацетоном для повышения проницаемости клеточной стенки. При этом выход аспарагиназы составлял только 56%. Кроме того, в данном случае требовались повторные процедуры фильтрации и центрифугирования для удаления субклеточных частиц. Наиболее привлекательным для широкомасштабного выделения аспарагиназы представляется щелочной лизис биомассы, примененный для выделения рекомбинантной ЕгА из 400 литров культуры *Erw. chrysanthemi* D2T/4 и позволяющий экстрагировать до 90% фермента [10]. Однако мы обнаружили, что НрА, в отличие от ЕгА, быстро и необратимо теряет активность при pH 10 и выше, а лизис при pH 9-9,5 требует значительного времени (>24 часов).

Таблица. Процедура выделения НрА.

Стадия 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
Хроматографии на SP-сефарозе	6	21	1911	91	62	18

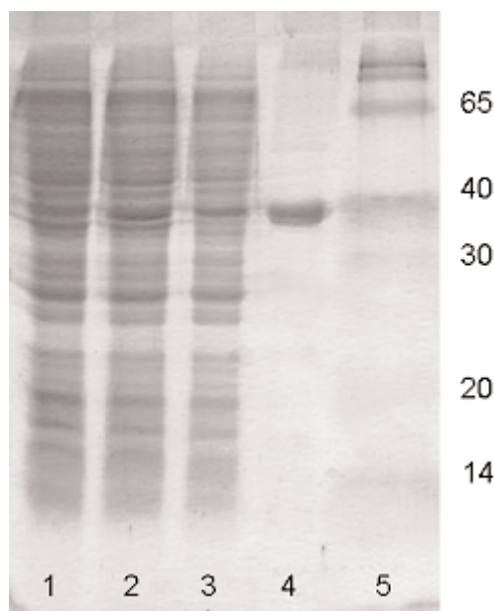


Рисунок.

Электрофорез в 12% СДН –ПААГ. Клеточный экстракт BL21(DE3)pLysE/pET22-HrA (1) до и (2) после 18-часовой индукции 0,5мМ ИПТГ; (3) растворимая часть клеточного экстракта; (4) очищенный препарат аспарагиназы НрА; (5) маркеры молекулярного веса (BioRad).

Мы использовали ультразвуковую обработку для получения бесклеточного экстракта, при этом выход фермента был достаточно высоким (более 90%). В случае крупномасштабного выделения для разрушения клеток вместо ультразвука возможно применение French Press. Это экономичный и эффективный способ получения бесклеточного экстракта, и при многократном пропускании биомассы через French Press выход аспарагиназы будет приближаться к 95-98%. Все последующие манипуляции с бесклеточным экстрактом, проведенные в данной работе, могут быть использованы без изменений (вне зависимости от применения ультразвука или French Press на начальном этапе выделения фермента).

Нанесение растворимой фракции бесклеточного субстрата на SP-сефарозу при pH 5,8 позволяет избавиться от основной массы балластных белков. Изоэлектрическая точка рекомбинантной аспарагиназы, определенная на основании аминокислотной последовательности НрА, равна 8,1. Поэтому более 95% НрА, нанесенной на сильный катионообменник SP-сефарозу при pH 5,5, связывается с сорбентом, а большинство белков *E. coli*, имеющих изоэлектрические точки (ИЭТ) в кислой области pH, обнаруживается в элюате (рисунок (треки 2,3)). При этом происходит освобождение НрА от примеси ЕсА (ИЭТ 4,7 [3]), которая вносит существенный вклад в аспарагиназную активность элюата, составляющую до 10 МЕ/мг. Очистка НрА от примеси ЕсА представляется важной с практической точки зрения. Эти два фермента обладают различной иммунологической специфичностью и могут обеспечить альтернативную терапию, если у пациента развивается гиперчувствительность к одной из аспарагиназ.

После промывания сорбента низкосолевым фосфатным буфером (pH 6,3) НрА элюировали тем же раствором при pH 7,0. Использование однокомпонентного элюата вместо градиента концентрации соли исключает необходимость дальнейшего обессоливания и концентрирования белка, а также позволяет значительно облегчить автоматизацию процесса выделения рекомбинантной аспарагиназы. После единственной хроматографической стадии очистки удельная активность фермента увеличилась в 18 раз по сравнению с исходной, и составляла 91 МЕ/мг. В некоторых случаях для обессоливания и концентрирования препарата применяли ультрафильтрацию с использованием фильтра 30 кДА. Эта процедура не приводила к дополнительным потерям активности фермента и не повышала его чистоту.

Глутаминазная активность НрА, измеренная при концентрации L-глутамина 5 мМ, оказалась крайне низкой, 0,0083 МЕ/мл, что составляет 0,01% от аспарагиназной активности. Это значение существенно ниже, чем величины глутаминазных активностей у современных терапевтических аспарагиназ *Escherichia coli* (1-2%) и *Erwinia chrysanthemi* (10%) [4], что указывает на перспективность использования НрА в качестве обладающего низким токсическим эффектом препарата для терапии лейкозов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта №2828 Международного научного и технического центра (США), и гранта № 06-04-49792 Российского фонда фундаментальных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Павлова М.П. (ред.) (1996) Гематологические болезни у детей. Учебн. пособие, Минск, 440 с.
2. Кривошеина Е.Л., Бельченко Д.И. (2005) Педиатрия, №3, 40-43.
3. Avramis V.I., Tiwari P.N. (2006) Int. J. Nanomedicine, **1**, 241-254.
4. Narta U.K., Kanwar S.S., Azmi W. (2007) Crit. Rev. Oncol. Hematol., **61**, 208-221.
5. Kafkewitz D, Bendich A. (1983) Am. J. Clin. Nutr., **37**, 1025-1030.

6. Derst C., Henseling J., Rohm K.H. (2000) Protein Science, **9**(10), 2009-2017.
7. Meister A. (1955) Methods in Enzymology vol. II, pp. 380-385, Academic Press, New York.
8. Hartree E.F. (1991) Anal. Biochem., **192**, 215-218
9. Lee S.M., Wroble M.H., Ross J.T. (1989) Appl. Biochem. Biotechnol., **22**, 1-11.
10. Goward C.R., Tattersall R., Atkinson T. (1992) Bioseparation, **2**, 335-341.

Поступила: 20.05.2008.

CLONING, EXPRESSION AND PURIFICATION OF *HELICOBACTER PYLORI* L-ASPARAGINASE

Yu.A. Gladilina, N.N. Sokolov, J. Krasotkina

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Moscow; tel./fax: (495) 246-3380;
e-mail: biomed_2005@bk.ru

Asparaginase from *Helicobacter pylori* has been cloned and expressed in *E. coli* cells. Optimization of culturing and expression conditions allowed achieving stable synthesis of catalytically active asparaginase amounting up to 6% of total bacterial protein. A method developed for enzyme purification included a single chromatographic stage and provided more than sixty percent yield of homogeneous asparaginase. Specific asparaginase and glutaminase activities were estimated to 92 and $8,3 \cdot 10^{-3}$ ME/mg respectively. Due to low glutaminase specificity HpA may be employed as a non-toxic drug for leukemia treatment.

Key words: recombinant L-asparaginase, acute lymphoblastic leucosis, *Helicobacter pylori*.