

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612-006.577.15
© Коллектив авторов

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ L-АСПАРАГИНАЗЫ ИЗ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

**О.Ю. Абакумова^{1*}, О.В. Подобед¹, А.А. Борисова¹, К.В. Сидорук²,
С.С. Александрова¹, Н.М. Омельянюк¹, М.В. Покровская¹, Л.И. Кондакова³,
Н.Н. Соколов¹**

¹Государственное учреждение Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121, г. Москва, Погодинская ул., 10; тел/факс (499)246-33-80/245-08-57; эл. почта: olga.abakumova@ibmc.msk.ru

²Государственный Научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, г. Москва

³Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН, г. Москва

Проведено исследование цитостатической активности рекомбинантной L-аспарагиназы из *Yersinia pseudotuberculosis* и L-аспарагиназы из *Erwinia carotovora* в отношении клеток Т-лимфобластической лейкемии человека: Jurkat и Molt-4, а также клеток солидных опухолей: - невриномы Гассерова узла крысы - НГУК-1, аденокарциномы молочной железы человека - MCF-7 и карциномы простаты человека - LnCap. В качестве препарата сравнения использовали L-аспарагиназу *E. coli* фирмы "Medak" (Германия). Полученные результаты указывают на то, что L-аспарагиназа *Y. pseudotuberculosis* подавляет рост, как лейкозных клеток, так и клеток солидных опухолей, при этом по эффективности действия сопоставима с L-аспарагиназой фирмы "Medak". Эти данные позволяют предположить, что новая L-аспарагиназа может быть использована для разработки лекарственных препаратов для терапии опухолей различных типов.

Ключевые слова: L-аспарагиназа, опухолевые клетки, цитотоксичность, *Yersinia pseudotuberculosis*.

ВВЕДЕНИЕ. Начиная с 70-х годов, бактериальная L-аспарагиназа применяется в терапии острых лимфобластных лейкозов человека в качестве противоопухолевого агента. Поскольку лимфобластные клетки проявляют слабую способность к синтезу аспарагина, снижение его содержания в крови и тканях под действием L-аспарагиназы приводит к подавлению роста этих клеток [1]. Как правило, препараты аспарагиназы обладают также и глутаминазойной активностью, быстро снижая концентрацию глутамина в плазме пациентов [2, 3].

Несмотря на множество накопленных экспериментальных данных, механизмы цитотоксического действия L-аспарагиназы, а также развивающейся

* - адресат для переписки

в результате терапии резистентности к ней опухолевых клеток до сих пор не выяснены. В основе резистентности клеток к снижению уровня содержания экзогенного аспарагина могут лежать особенности ответа клетки на аминокислотное голодание на геномном уровне [4], нарушения ранних стадий апоптоза, индуцированные L-аспарагиназой [5, 6] и высокая активность аспарагинсинтетазы [7, 8]. Так, согласно последним данным, чувствительность разных линий клеток опухоли яичника к действию L-аспарагиназы находится в обратной зависимости от уровня экспрессии аспарагинсинтетазы в этих клетках [8].

В настоящее время в клинической практике для лечения острых лимфобластных лейкозов, острых миелобластных лейкозий, миелом, различных лимфом используются лекарственные препараты на основе периплазматических аспарагиназ из диких штаммов *E. coli* и *Erw. Chrysanthemi* [9-12]. Однако, проблемы, связанные с наличием серьезных побочных эффектов противоопухолевой терапии препаратами L-аспарагиназы (тромбоэмболия, аллергические реакции, дисфункции печени и поджелудочной железы), остаются нерешенными [13-15]. Поэтому получение рекомбинантных L-аспарагиназ из новых источников и определение их свойств не теряет своей актуальности.

Мы провели сравнительное исследование цитотоксического действия новой L-аспарагиназы из *Y. pseudotuberculosis* и полученной ранее L-аспарагиназы из *Erw. carotovora* на клетки Т-лимфобластоидной лейкемии человека: Jurkat и Molt-4, а также на клетки солидных опухолей: НГУК-1, MCF-7 и LnCap. В качестве препарата сравнения использовали L-аспарагиназу *E. coli* фирмы "Medak" (Германия).

МЕТОДИКА. *Использованные штаммы микроорганизмов.* Штамм-продуцент *E. coli*/pET/YERS был получен трансформированием клеток *E. coli* BL-21(DE3) плазмидой pET23a ("New England Biolabs", США), в которую был встроен ген L-аспарагиназы *Y. pseudotuberculosis*. Ген был собран из ДНК-фрагментов, полученных методом ПЦР с помощью синтетических олигонуклеотидных праймеров, в которые при синтезе были введены последовательности, содержащие сайты рестрикции NdeI и EcoRI.

Культивирование микроорганизмов проводили в колбах объемом 1 л, содержащих 250 мл среды LB с ампициллином (0,1 мМ) при pH 7,2-7,4, температуре 37°C, со скоростью перемешивания 180 об/мин.

Определение активности L-аспарагиназы. Активность фермента определяли с использованием реактива Несслера [16]. Метод основан на определении количества аммиака, выделяющегося при гидролизе L-аспарагина, катализируемого L-аспарагиназой, при взаимодействии с реактивом Несслера. За единицу активности L-аспарагиназы (МЕ – международная единица) принимали такое количество фермента, 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 Sedmak [17].

Выделение и очистка L-аспарагиназы. Все операции проводили при 4°C. Бактериальные клетки разрушали с помощью ультразвука и белки осаждали сульфатом аммония до конечной концентрации 60% от насыщения, обессоливание проводили на колонке с Сефадексом G25 ("Amercham-Pharmacia", Швеция) и фермент выделяли на анионите Q Сефароза FF ("Amercham-Pharmacia", Швеция). Фермент элюировали линейным градиентом (0 М – 0,5 М) KCl (10 мМ К-фосфатный буфер pH 7,6; 1 мМ ЭДТА; 1 мМ глицин).

Культура клеток. Клетки НГУК-1 (невринома Гассерова узла крысы) были получены из НИИ морфологии человека РАМН, MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека) и LnCap (карцинома простаты человека) из American Type Culture Collection, (США), Molt-4 и Jurkat (обе линии – Т-лимфобластная лейкемия) были получены из коллекции культур клеток Всероссийского Научного центра молекулярной диагностики и лечения, Москва.

Клетки НГУК-1, Molt-4 и Jurkat культивировали в среде RPMI 1640 ("Gibco", США), клетки MCF-7 – в среде DMEM ("Gibco"), клетки LnCap в смеси сред

DMEM и RPMI 1640 (1:1) с добавлением 5% термоинактивированной лошадиной сыворотки ("Gibco"). Во все среды добавляли 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, "Gibco"). Среда содержала 2 мМ глутамин и антибиотики пенициллин и стрептомицин, 10 ед/мл и 10 мкг/мл, соответственно.

Для проведения экспериментов по определению цитотоксичности препаратов L-аспарагиназы клетки в логарифмической фазе роста пассировали в 96-ти луночные планшеты в объеме 100 мкл. Клетки преинкубировали в планшетах в течение 24 часов для их адаптации перед добавлением препаратов в CO₂-инкубаторе при 37°C. Затем к клеткам добавляли препараты L-аспарагиназ в 10 мкл раствора Хенкса (в конечных концентрациях: 0,02, 0,05, 0,2, 0,5, 2,0, 5,0 и 10 МЕ/мл), и через 72 часа эксперимент останавливали. Активность препаратов L-аспарагиназ тестировали перед каждым экспериментом по определению их цитотоксичности.

Определение цитотоксичности. Цитотоксичность препаратов измеряли, используя МТТ-тест [18] и определяя количество клеток, выживших через 72 часа культивирования. Для этого к клеткам добавляли 50 мкл 0,5%-ного раствора МТТ-реактива ("ДиаЭм", Россия) и помещали в CO₂-инкубатор на 3 часа. После чего среду из лунок клеток НГУК-1, MCF-7 и LnCap тщательно удаляли микропипеткой, а из суспензионных культур Molt-4 и Jurkat среду удаляли при помощи центрифугирования планшетов в центрифуге Eppendorf при 800 g. Для растворения кристаллов формазана в лунки наливали 100 мкл DMSO, и интенсивность окраски измеряли на мультискане EX Labsystems (Финляндия) при длине волны 540 нм. Количество выживших клеток рассчитывали в процентах к контролю, которым служили клетки, культивируемые без добавления препаратов. Статистическую обработку проводили, определяя величины среднего и стандартного отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Удельная активность L-аспарагиназы *Y. pseudotuberculosis* составляла 106 МЕ/мг белка. Выход фермента был на уровне 56%. Чистота фермента составляла более 95%. При изоэлектрофокусировании препарата на колонке с амфолинами в интервале pH 4,0 – 8,0 было установлено, что изоэлектрическая точка рекомбинантной L-аспарагиназы находится в области pH 5,4 ± 0,05. Этот результат соответствует значению изоэлектрической точки фермента, рассчитанной теоретически. Оптимум pH действия рекомбинантной аспарагиназы, определенный в калий-фосфатном (pH 5,8 - 8,0), боратном (pH 8,1 – 10,7) и Трис-HCl (pH 7,8 - 9,7) буферных растворах находится в интервале значений pH от 6,0 до 9,0. Температурный оптимум действия фермента определен в диапазоне температур от 37°C до 70°C.

Результаты проведенного исследования действия L-аспарагиназ *Y. pseudotuberculosis*, *Erw. carotovora* и *E.coli* ("Medak") на культуры опухолевых клеток показывают, что все ферменты подавляют их рост. Инкубация клеток различных линий с возрастающими количествами L-аспарагиназ приводит к значительному снижению числа жизнеспособных клеток (рис. 1), которое имеет дозозависимый характер. При этом чувствительность разных линий клеток к цитотоксическому действию этих ферментов не одинакова. Сравнивая действие L-аспарагиназ на лимфобластные клетки, можно сделать вывод, что клетки линии Molt-4 более чувствительны, чем Jurkat. Уменьшение на 50% числа живых клеток Molt-4 начинается при концентрации в культуральной среде L-аспарагиназ *Y. pseudotuberculosis* и "Medak" 0,2 МЕ/мл (рис. 1а), тогда как более 70% клеток Jurkat сохраняют в этих условиях жизнеспособность (рис. 1б). Различия в чувствительности двух линий клеток сохраняются и при использовании высоких концентраций ферментов. Можно видеть (рис. 1а), что через 72 часа после начала инкубации с 10 МЕ/мл L-аспарагиназ число жизнеспособных клеток Molt-4 уменьшается приблизительно на 60-70%, а более устойчивых клеток Jurkat – менее, чем на 50% (рис. 1б).

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ L-АСПАРАГИНАЗЫ

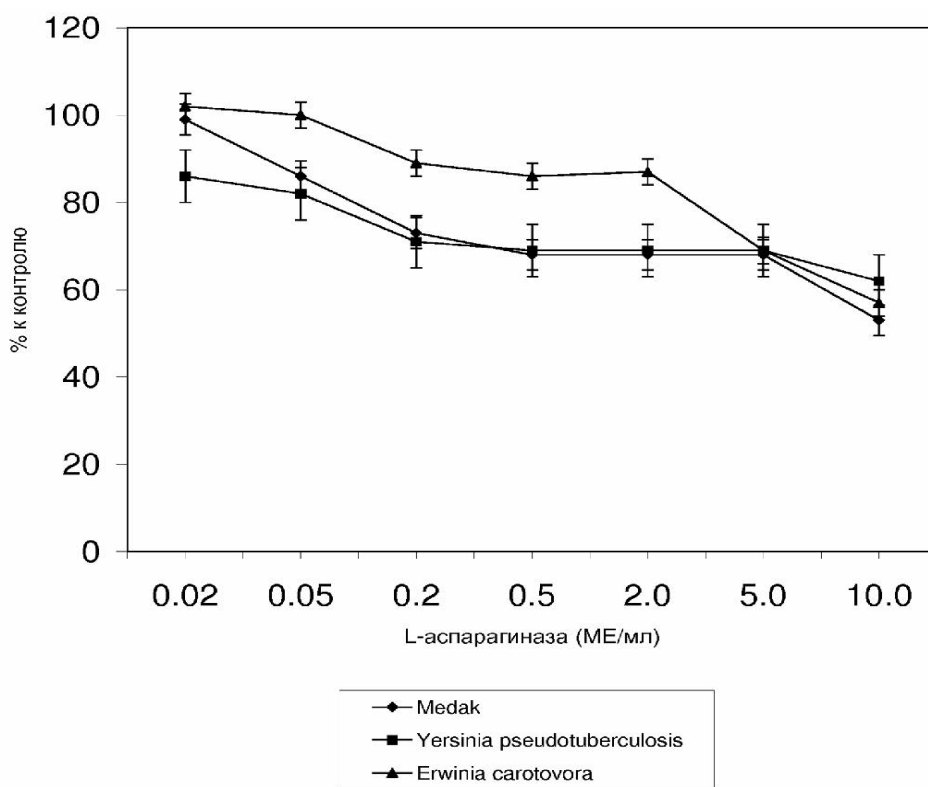
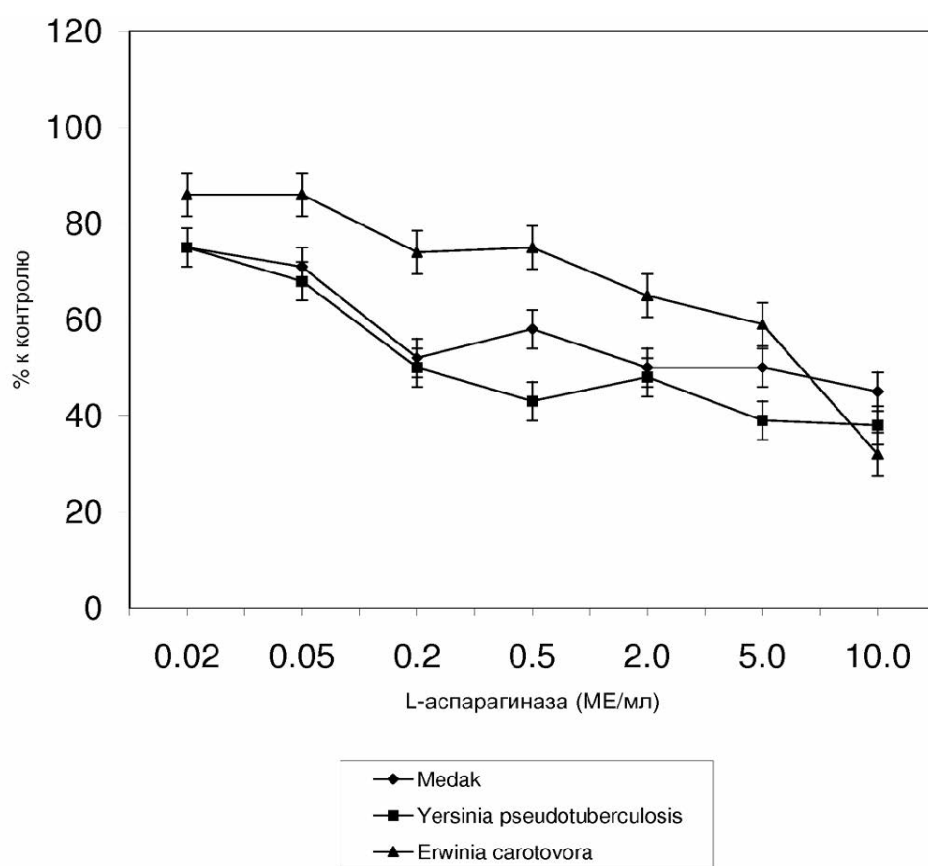


Рисунок.
Цитотоксичность L-аспарагиназ для различных линий опухолевых клеток.
а – MOLT, б – Jurkat, в – MCF-7, г – НГУК1, д - LnCap.

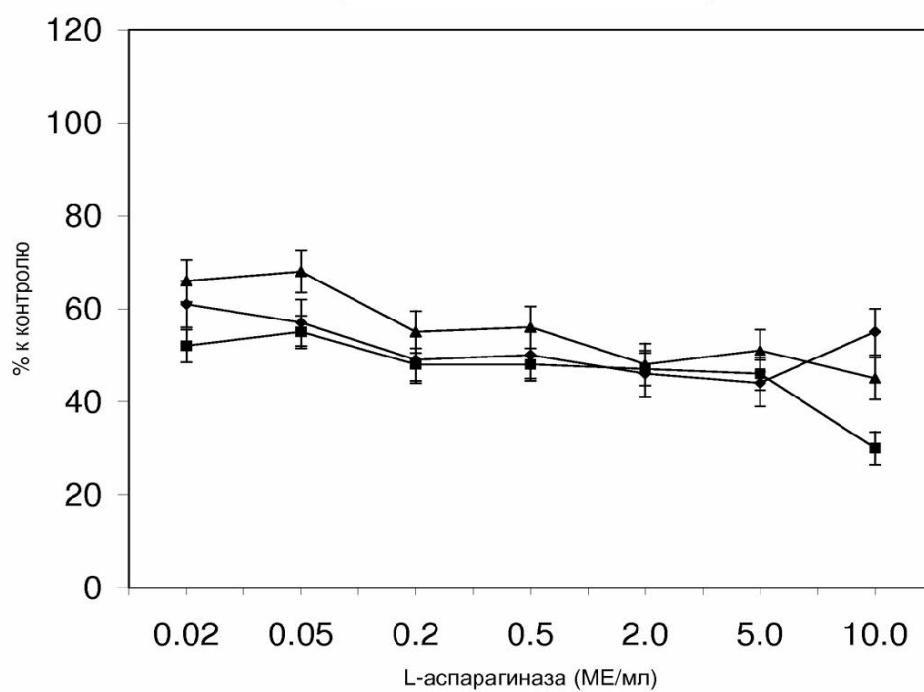
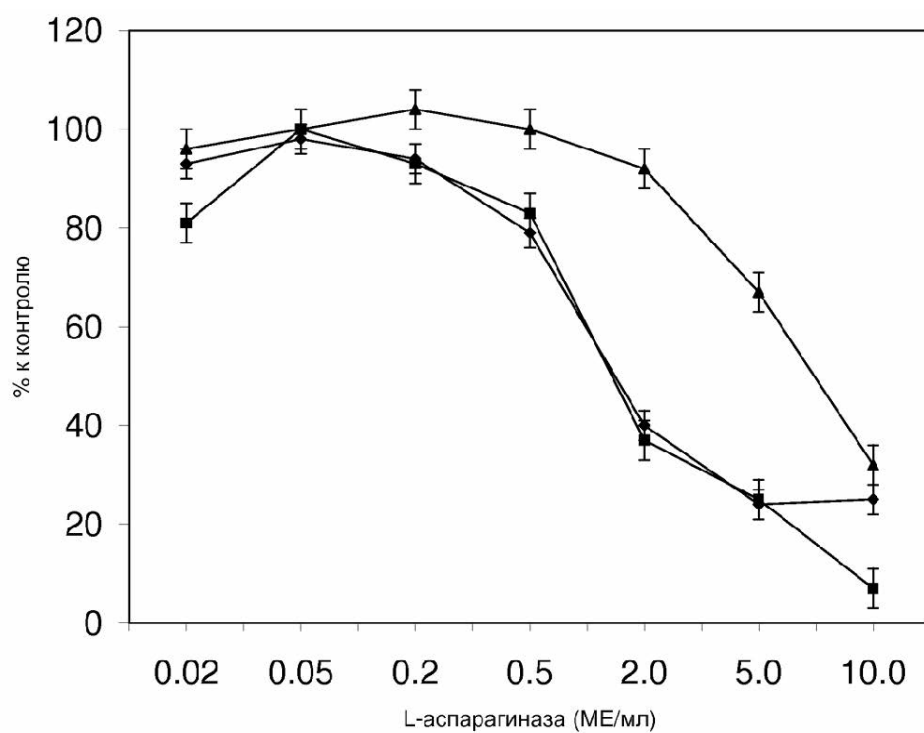


Рисунок. (продолжение).

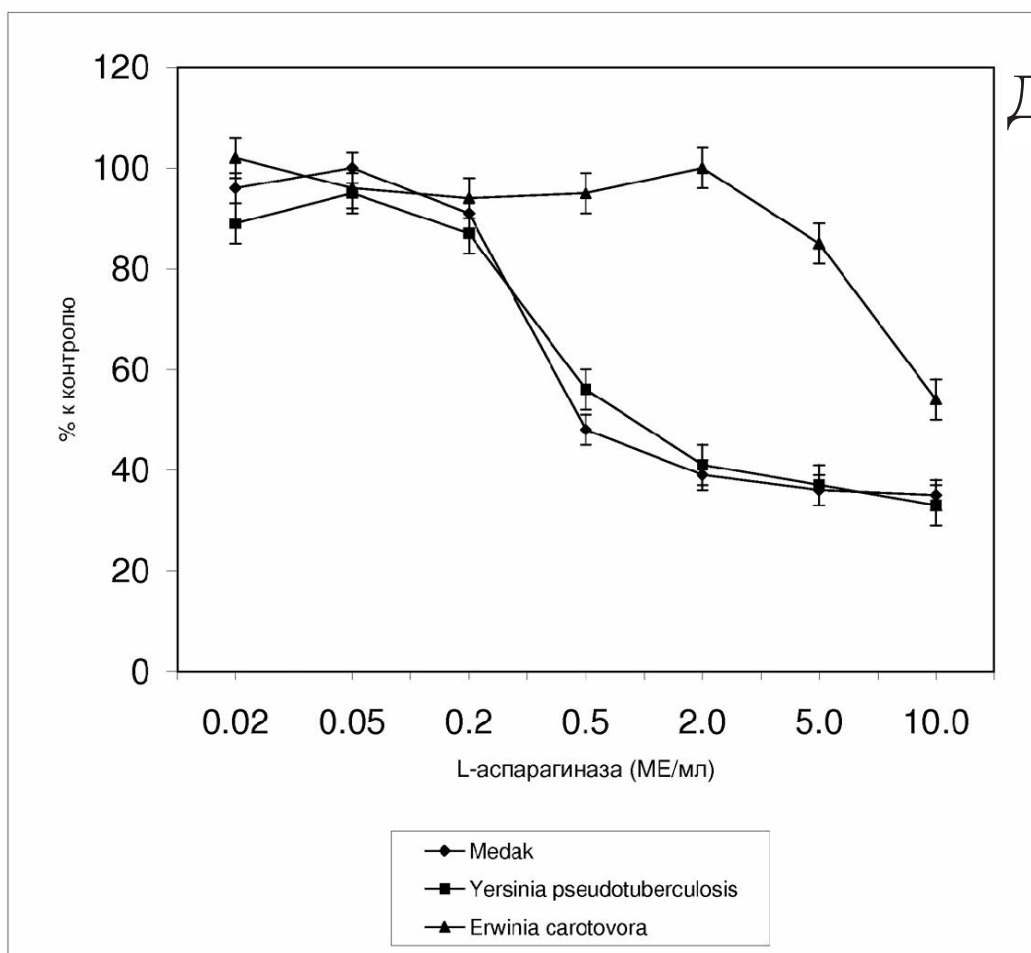


Рисунок. (продолжение).

Клетки карциномы молочной железы MCF-7 проявляют заметно более высокую чувствительность к действию L-аспарагиназ, особенно *Y. pseudotuberculosis* и “Medak” по сравнению с клетками Jurkat и Molt-4 (рис. 1в). Так, при использовании 10 МЕ/мл фермента максимальное подавление роста клеток MCF-7 достигает 80-90%. Однако инкубация в присутствии L-аспарагиназ других клеток солидных опухолей НГУК-1 и LnCap приводит к подавлению их роста примерно в той же степени, что и лимфобластных (рис. 1г, д).

Следует отметить, что для разных линий клеток вид кривых зависимости числа жизнеспособных клеток от активности фермента существенно различается. Эти отличия наиболее заметны при сравнении кривых для MCF-7 с одной стороны и для НГУК-1, Jurkat и Molt-4 с другой. В первом случае, начиная с дозы 2,0 МЕ/мл, наблюдается резкое уменьшение числа выживших клеток, во втором — кривая выходит на плато, свидетельствующее о наличии популяции резистентных клеток.

Сравнивая между собой эффективность действия L-аспарагиназ различного происхождения, можно отметить, что способность подавлять рост клеток выше у L-аспарагиназы *Y. pseudotuberculosis*, чем у фермента *Erw. carotovora*. Как уже было отмечено, заметное (на 50%) уменьшение числа живых клеток Molt-4 начинается при инкубации клеток с 0,2 МЕ/мл L-аспарагиназы *Y. pseudotuberculosis* (рис. 1а). В этой же концентрации L-аспарагиназа *Erw. carotovora* проявляет слабую цитостатическую активность, которая сохраняется и при увеличении концентрации фермента до 5,0 МЕ/мл. Аналогичный результат получен и для

клеток LnCap (рис. 1д). В этом случае подавление роста клеток L-аспарагиназой *Y. pseudotuberculosis* происходит уже при концентрации этого фермента в культуральной среде 0,5 МЕ/мл, в то время как для достижения такого же действия необходимо 10,0 МЕ/мл фермента *Erw. carotovora*.

Новая рекомбинантная L-аспарагиназа также более эффективно подавляет рост клеток Jurkat и MCF-7 по сравнению с ферментом *Erw. carotovora*, однако это различие менее выражено для клеток НГУК-1. Между тем сравнение активности ферментов фирмы "Medak" и аспарагиназы *Y. pseudotuberculosis* позволяет сделать вывод о том, что последняя по своей эффективности не уступает лучшим коммерческим препаратам. Результаты, представленные в настоящем сообщении демонстрируют значительную цитостатическую активность L-аспарагиназы *Y. pseudotuberculosis* по отношению к клеткам солидных опухолей: НГУК-1, MCF-7 и LnCap. Нами также установлено, что этот фермент не влияет на рост нормальных фибробластов кожи человека в культуре. Дальнейшие исследования в этом направлении могут способствовать разработке препаратов L-аспарагиназы для эффективной терапии не только лейкозов, но и других опухолей человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов МНТЦ №2828 и РФФИ № 06-04-49792-А.

ЛИТЕРАТУРА

1. Broome J.D. (1981) Cancer Treat Rep., **65**, Suppl. 4, 111-114.
2. Ollenschlager G., Roth E., Linkesch W., Jansen S., Simmel A., Modder B. (1988) Eur. J. Clin. Invest., **18**, 512-516.
3. 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. (2006) J. Biol. Chem., **281**, 31222-31233.
4. Fine B.M., Kaspers G.J.L., Ho M., Loonen A.H., Boxer L.M. (2005) Cancer Res., **65**, 291-299.
5. Holleman A., denBoer M.L., Kazemier K.M., Janka-Schaub G.E., Pieters R. (2003) Blood, **15**, 4541-4546.
6. Aslanian A.M., Fletcher B.S., Kilberg M.S. (2001) Biochem. J., **357**, 321-328.
7. Lorenzi P.L., Reinhold W.C., Rudelius M., Gunsior M., Shankavaran U., Bussey K.J., Scherf U., Eichler G.S., Martin S.E., Chin K., Gray J.W., Kohn E.C., Horak I.D., Von Hoff D.D., Raffeld M., Goldsmith P.K., Caplen N. J., Weinstein J.N. (2006) Mol. Cancer Ther., **5**, 2613-2623.
8. Taylor C.W., Dorr R.T., Fanta P., Herch E.M., Salmon S.E. (2001) Cancer Chemother. Pharmacol., **47**, 83-88.
9. Соколов Н.Н., Занин В.А., Александрова С.С. (2000) Вопр. мед. химии, **46**, 531-548.
10. Perel G., Auvrignon A., Leblax T., Vannier J.R., Michel G., Nelken G., et al. (2002) J. Clin. Oncol., **20**, 2774-2782.
11. Kantarjan H.M. (1994) Am. J. Med., **97**, 176-184.
12. Fiere D., Danaila C. (1996) Rev. Prat., **46**, 55-61.
13. Meschi F., diNatal B., Rondanini G.F., Uderzo C., Jancovic M., Masera G., Chiumello G. (1981) Horm. Res., **15**, 237-241.
14. Durden D.L., Salazar A.M., Distasio J.A. (1983) Cancer Res., **43**, 1602-1605.
15. Cairo M.S. (1982) Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol., **4**, 335-339.
16. Wade H.E., Philips B.P. (1977) Anal. Biochem., **72**, 248.
17. Sedmak G.G., Grossberry S.E. (1977) Annal. Biochem., **79**, 544-552.
18. Mossman T. (1983) J. Immunol. Meth., **65**, 55-63.

Поступила: 15. 05. 2008.

ANTITUMOR ACTIVITY OF L-ASPARAGINASE FROM
YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS

*O.Yu. Abakumova¹, O.V. Podobed¹, A.A. Borisova¹, K.V. Sidoruk², S.S. Alexandrova¹,
N.M. Omelyanuk¹, M.V. Pokrovskaya¹, L.I. Kondakova³, N.N. Sokolov¹*

¹Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry Russian Academy of Medical Sciences,
Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; tel./fax: (499) 246-33-80/ 245-08-57;
e-mail olga.abakumova@ibmc.msk.ru

²Research Institute of Genetics, Moscow, Russia

³Research Institute of Human Morphology Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

The cytotoxic activity of L-asparaginases from *Yersinia pseudotuberculosis* and from *Erwinia carotovora* were investigated in vitro using several tumor cells lines: Jurkat and Molt-4 (human T-lymphoblastic leukemia), MCF-7 (human breast adenocarcinoma), LnCap (human prostate carcinoma), NGUK1 (rat Gasser node neurinoma). *E. coli* L-asparaginase produced by “Medak” (Germany) was used as a reference. The cell growth inhibition data indicate that *Y. pseudotuberculosis* L-asparaginase significantly inhibits growth of leukemic and solid tumor cells. These results allow us to conclude that this L-asparaginase can be used for the development of new preparations for the therapy of different types of tumors.

Key words: L-asparaginase, tumor cells, cytotoxicity, *Yersinia pseudotuberculosis*.