

УДК 612.015.1577.151.6

© Коллектив авторов

**РЕКОМБИНАНТНАЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ L-АСПАРАГИНАЗА  
*RHODOSPIRILLUM RUBRUM* С НИЗКОЙ L-ГЛУТАМИНАЗНОЙ  
АКТИВНОСТЬЮ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫМ ЭФФЕКТОМ**

**М.В. Покровская<sup>1</sup>, В.С. Покровский<sup>1,2\*</sup>, С.С. Александрова<sup>1</sup>,  
Н.Ю. Анисимова<sup>2</sup>, Р.М. Андрианов<sup>3</sup>, Е.М. Трещалина<sup>2</sup>,  
Г.В. Пономарев<sup>1</sup>, Н.Н. Соколов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Учреждение Российской академии медицинских наук  
Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В.Н. Ореховича РАМН, ул. Погодинская, д. 10, 119121, Москва;  
эл. почта: vadimpokrovsky@yandex.ru

<sup>2</sup>Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН,  
Каширское шоссе, д. 24, 115478, Москва,

<sup>3</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Ленинский просп., д. 33, стр. 2,  
119071, Москва,

Получен рекомбинантный штамм-продуцент и разработана процедура очистки L-аспарагиназы *Rhodospirillum rubrum* (RrA). Показано, что RrA имеет следующие физико-химические и каталитические характеристики:  $K_m$  для L-аспарагина 0,22 мМ, оптимум pH 9,2; температуры 54°C; pI 5,1. Значимый цитотоксический эффект RrA выявлен на клеточных линиях K562 ( $IC_{50}$ =1,80 МЕ/мл), DU145 ( $IC_{50}$ =9,19 МЕ/мл), MDA-MB-231 ( $IC_{50}$ =34,62 МЕ/мл). По сравнению с L-аспарагиназой *E. coli* II типа (EcA) и *Erwinia carotovora* (EwA) цитотоксичность на этих клеточных линиях убывает в ряду EcA>RrA>EwA. На мышцах с L5178у при ежедневном 10-кратном внутрибрюшинном введении RrA в разовой дозе 4000 МЕ/кг (суммарная доза 40000 МЕ/кг)  $T/C=172$ . Полученные результаты позволяют отнести RrA к внутриклеточным L-аспарагиназам с низкой L-глутаминазной активностью и выраженным антипролиферативным эффектом.

**Ключевые слова:** *Rhodospirillum rubrum*, внутриклеточная L-аспарагиназа, антипролиферативная активность.

**ВВЕДЕНИЕ.** На протяжении последних 30 лет L-аспарагиназы (КФ 3.5.1.1.) из *E. coli* (EcA) и *Erwinia chrysanthemi* (ErA) включают в схемы стандартной индукционной терапии острого лимфобластного лейкоза [1]. EcA также применяют при лечении лимфогранулематоза, множественной миеломы, NK/T-клеточной и кожной T-клеточной лимфомы [2–6]. Опыт клинического применения EcA позволил выявить ограничивающие использование этого препарата побочные эффекты; некоторые из них, например, гепатотоксичность, нарушения свертываемости крови и нейротоксичность связывают с L-глутаминазной активностью [7–10]. Дезаминирование L-глутамин в плазме крови лишает нормальные клетки возможности внутриклеточного синтеза L-аспарагина и приводит образованию избыточного количества L-глутаминовой кислоты, опосредующего некоторые токсические эффекты [11, 12]. Эта гипотеза была подтверждена результатами клинического

\* - адресат для переписки

изучения фермента из *Acinetobacter*, обладающего высокой L-глутаминазной активностью и выраженной нейротоксичностью. С другой стороны, доклиническое изучение L-аспарагиназы *W. succinogenes*, лишённой L-глутаминазной активности, продемонстрировало, в отличие от EcA, отсутствие гепатотоксичности или иммуносупрессивного эффекта *in vivo* [11, 13, 14]. Помимо L-аспарагиназы *W. succinogenes*, из изученных L-аспарагиназ L-глутаминазная активность практически отсутствует только у L-аспарагиназы *Helicobacter pylori* [15, 16]. Другая группа побочных эффектов обусловлена иммуногенностью белковых препаратов и напрямую связана с длиной аминокислотной последовательности и четвертичной структурой фермента. Это определяет актуальность поиска источников новых короткоцепочечных L-аспарагиназ с низкой L-глутаминазной активностью и изучения их биохимических и биологических свойств.

Среди перспективных для изучения ферментов можно выделить L-аспарагиназу *Rhodospirillum rubrum* (RrA), которая отличается в 2 раза более короткой аминокислотной последовательностью (172 аминокислотных остатка) и низкой гомологией по сравнению с EcA и ErA. Для полноценного доклинического изучения RrA необходимо создание рекомбинантного штамма-продуцента, т.к. природные штаммы *R. rubrum* отличаются медленным ростом на специфических средах и низкой экспрессией RrA [17, 18]. Таким образом, короткоцепочечные L-аспарагиназы с низкой L-глутаминазной активностью представляют интерес как ферменты с более высокой специфичностью и, возможно, меньшей иммуногенностью.

Цель работы — получение рекомбинантной L-аспарагиназы *R. rubrum* и изучение её физико-химических, каталитических свойств и антипролиферативного эффекта.

#### МЕТОДИКА.

Реактивы. L-аспарагин (“Reanal”, Венгрия), глицин,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , KCl (“Serva”, Германия), L-глутамин, 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,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (“Реахим”, Россия).

**Клонирование RrA.** Ген RrA был выделен из штамма *Rhodospirillum rubrum* (коллекция кафедры микробиологии МГУ им. М.В. Ломоносова). Использован вектор pET23a (“Novagen”), праймеры GCCCCTTCCCTTGCCACAGG, GGACACCCAAGCTTCCCTTTTCCG, CACAGGATCCTCAAGGCAAATGGCCG. При работе с ДНК применяли стандартные методы молекулярной биологии [19]. Полученные клоны *E. coli* B F-dcm *ompT hsdS* ( $r_B^-$  m $B^-$ ) *gal*  $\lambda$ (DE3) (“Stratagene”, США) были проверены на наличие аспарагиназной активности с помощью комплексонометрического метода на плотной среде с использованием гексацианоферрата калия и сульфата меди [20].

**Бактериальный штамм и его культивирование.** Активный продуцент культивировали в колбах Эрленмейера объёмом 1 л в 200 мл среды LB с ампициллином (100 мкг/мл) на качалке “GFL 3033” (Германия) при температуре 37°C. Плотность культуры определяли на спектрофотометре “Aquarius 7000” при длине волны 600 нм и выражали в оптических единицах ( $\text{OE}_{600}$ ). Индуктор (лактоза, IPTG), добавляли в среду при оптической плотности 0,9–1,9 при 600 нм до конечной концентрации 0,2% и 0,001 М, соответственно. После индукции наработку биомассы продолжали в течение 17–20 ч.

**Выделение и очистка L-аспарагиназы.** После окончания инкубации клетки осаждали центрифугированием (15 мин, 2500 g). Биомассу

ресуспендировали в буфере А (10 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 мМ глицина, 1 мМ ЭДТА, рН 7,5) и подвергали ультразвуковой обработке (дезинтегратор УЗДН-2Т, Россия) в течение 10 мин (1 мин озвучивания, 1 мин перерыв). Клеточный экстракт получали центрифугированием озвученной суспензии (60 мин, 35000 g) и наносили на колонку с Q-Sepharose (2,0×30,0 см), уравновешенную буфером А. Фракции, содержащие RrA, разбавляли в 10 раз буфером А, объединяли и наносили на колонку с DEAE-Toyopearl 650m (1,5×20,0 см), уравновешенную буфером А. В обоих случаях белок элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0,0–1,0 М). Скорость элюции составляла 78 и 30 мл/час, соответственно. На заключительном этапе выделения раствор фермента обессоливали и концентрировали в ячейке “Amicon”, содержащей фильтр Millipore (NMWL 18000). Все стадии очистки проводили при 4°C. Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури [21]. Изоэлектрическую точку определяли путём изоэлектрофокусирования на колонке “LKB” при рН 4,0–10,0 [22].

В качестве контрольных препаратов использовали лекарственный препарат EcA (“Medak”), а также аналогичную ErA рекомбинантную L-аспарагиназу *Erwinia carotovora* (EwA) [23].

*Определение молекулярной массы* очищенного белка проводили с помощью электрофореза и масс-спектрометрии. Электрофорез проводили по методу Лэммли [22]. В качестве маркеров использовали белковые стандарты (“Pharmacia”, Amersham #17-0446-01). Масс-спектрометрический анализ проводили на времяпролетном масс-спектрометре Bruker Ultraflex II (“Bruker Daltonics”, Германия) в режиме положительных ионов с использованием десорбции Nd:YAG лазером (длина волны 355 нм), при ускоряющем напряжении 25 кВ. Регистрацию спектров проводили в режиме рефлектона, для спектров пептидного картирования (идентификации белков) и в линейном режиме для определения молекулярных масс целого белка. Полученные масс-спектры были обработаны с использованием программы Bruker Flex Analysis 2.4.

*Определение ферментативной активности L-аспарагиназы.* Активность фермента определяли методом прямой несслеризации [24, 25]. За единицу активности L-аспарагиназы (1 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. Продуктивность культуры выражали в МЕ/ОЕ<sub>600</sub>.

Зависимость активности от рН изучали при 37°C в стандартных буферных растворах: натрий-ацетатном (рН 3,0–6,0), натрий-фосфатном (рН 6,0–8,0), TRIS-HCl (рН 7,0–9,0), боратном (рН 9,0–11,0) [26]. Зависимость удельной активности RrA от ионной силы исследовали, изменяя концентрацию KCl от 100 до 3000 мМ. Влияние температуры на активность изучали в диапазоне 30–80°C при рН 7,0.

Определение  $K_m$  проводили по скорости образования аммиака при ферментативном гидролизе L-аспарагина и L-глутамина. Аспарагиназную активность определяли в термостатируемой при 37°C ячейке, рН 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 RrA (0,5–10 мг/мл). Измерение аммиака проводили с использованием реактива Несслера. Реакцию останавливали, добавляя 0,6 мл 10% раствора ТХУ. Величину поглощения определяли при длине волны 480 нм. Графическую обработку полученных данных и расчет  $K_m$  и  $V_{\text{макс}}$  проводили при помощи программы Microsoft Excel по методу двойных обратных величин Лайнуивера–Берка.

*Изучение температурной и химической денатурации.* Стабильность RgA исследовали при инкубации в фосфатном буфере в течение 3 мин при различных температурах до 80°C, а также в течение 1 ч с 0–8,0 М концентрацией мочевины, после чего оценивали ферментативную активность стандартным способом [24, 25]. За 100% принимали активность фермента, определяющуюся при 37°C в отсутствие мочевины.

*Изучение цитотоксичности.* Активность RgA тестировали в сравнении с EcA и EwA на линии клеток хронического миелолейкоза человека K562 (коллекция опухолевых штаммов РОНЦ), линии клеток рака предстательной железы человека DU145 (“ATCC”, США) и двух линиях клеток рака молочной железы человека MDA-MB-231 и MCF-7 (“ATCC”, США). Клетки культивировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в среде RPMI 1640 (“ПанЭко”, Россия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (“HyClone Laboratories Logan”, Великобритания), инактивированной при 56°C в течение 30 мин, 2 mM L-глутамина, 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл сульфата стрептомицина (“ПанЭко”). Достижение логарифмической фазы роста клетки пассировали в плоскодонные 96-луночные микропланшеты (“Costar”) по 5–6×10<sup>4</sup> клеток на лунку и преинкубировали в течение 24 ч перед добавлением тестируемых ферментов в указанных выше условиях. Световую микроскопию клеток проводили с помощью системы AxioVision 4 (“Zeiss”, Германия). Жизнеспособность клеток определяли по исключению красителя трипанового синего (“ПанЭко”). Подсчёт клеток проводили в камере Горяева. Препараты L-аспарагиназ в растворе Хенкса (“ПанЭко”) в диапазоне уменьшающихся концентраций 0,000062–50 МЕ/мл добавляли в лунки с клеточной культурой и коинкубировали в течение 72 ч. В контрольные лунки добавляли раствор Хенкса в том же объёме. Количество живых клеток в лунках по окончании периода инкубации определяли с помощью МТТ-теста, основанного на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (МТТ) до фиолетовых кристаллов формазана, растворимых в диметилсульфоксиде [27]. Оптическое поглощение окрашенных растворов измеряли на планшетном фотометре Multiskan MS (“Labsystem”, Финляндия) при λ=540 нм. Цитотоксичность тестируемых растворов соединений оценивали по формуле:  $(1 - No/Nk) \times 100\%$ , где No — оптическое поглощение в опытных пробах, Nk — оптическое поглощение в контроле. Для каждого фермента методом нелинейной регрессии рассчитывали IC<sub>50</sub> — концентрацию фермента в среде, которая вызывала снижение количества живых клеток на 50%, а также определяли минимальную эффективную концентрацию (C<sub>min</sub>), вызывающую достоверное по отношению к контролю ингибирование пролиферации.

*Изучение противоопухолевой активности.* Использованы мыши-самки линии DBA<sub>2</sub> массой тела 18–24 г с внутрибрюшинно (в/б) трансплантированным лимфаденозом Фишера L5178у (5-й пассаж) из Банка опухолевых штаммов РОНЦ [28, 29]. Перед лечением животных распределяли на опытную и контрольную группы (n=7). На 1–10 сутки после трансплантации опухолевых клеток мышам опытной группы ежедневно вводили раствор субстанции RgA (100 МЕ/мл, в/б, растворитель — 0,9% раствор натрия хлорида) в разовой дозе 4000 МЕ/кг, мышам контрольной группы вводили в/б 0,3 мл растворителя в том же режиме.

Эффективность лечения оценивали по увеличению продолжительности жизни в сравнении с контрольной группой (Т/С), которое рассчитывали как отношение средней продолжительности жизни (СПЖ) в обеих группах и выражали в процентах. В контрольной группе Т/С=100%. Излеченными



считали мышей, проживших более 60 сут. без признаков опухолевого процесса на аутопсии (асцит, узловой рост, поражение брыжеечных лимфатических узлов) [29]. При расчёте СПЖ излеченных мышей не учитывали. Переносимость лечения оценивали по изменению массы тела мышей, двигательной активности и наличию изменений внутренних органов на аутопсии.

**Статистическая обработка.** Статистический анализ результатов экспериментов на культурах клеток проводили, рассчитывая значения медианы и размах 25-го и 75-го квартилей данных в группах (Med, 25–75%). Статистическую обработку выживаемости мышей проводили с использованием *log-rank* теста и построением кривых Каплана–Майера. Достоверными считали различия при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ.

**Характеристики рекомбинантного штамма-продуцента RrA.** Ген RrA клонирован в векторе pET23a по сайтам рестрикции HindIII и Bam HI и экспрессирован в штамме *E. coli* BL21 (DE3). Стабильность полученного продуцента была подтверждена рестрикционным анализом и высокой экспрессией RrA в культуре (20–30 МЕ/мл), уровень которой не снижался при 12 пересевах. Секвенирование выделенных из 4 клонов плазмид с последующим компьютерным анализом (*SIB BLAST network service*) показало идентичность вставки с уже известной последовательностью гена Rru\_A3730 из *R. rubrum* (ATCC 11170/NCIB 8255), состоящего из 519 нуклеотидов, за исключением двух нуклеотидных замен (рис. 1). Замена C261T не изменила аминокислотную последовательность. Мутация A445G привела к замене K149E. Молекулярная масса мономера RrA, по данным масс-спектрометрии, составила 19,1 кДа, по данным электрофореза — 20 кДа. Полученный фермент состоит из 172 аминокислотных остатков.

```

DNA: ATGGCCGTTTCCCCCTCGCCCCTGCGCATCTTCACCGCCGGCGGGACCATC      51
+1: M A V S P S P L R I F T A G G T I
DNA: GATAAAGACTATCGCCTGGAAGAAAACGGGCTGGTTCGTCCGCGACCCCTTC      102
+1: D K D Y R L E E N G L V V G D P F
DNA: GTCGCCGAGGTCCTGAAAACGGCCCGTCTGGCGGGCGCGGTGTCTGATTGTCT      153
+1: V A E V L K T A R L A G A V S I V
DNA: GCGCTGTCTCGCAAGGATAGCCTGGATTTCACCGAGGCCGACCGCGAAGCG      204
+1: A L S R K D S L D F T E A D R E A
DNA: ATCGGCCCGGGCGGTTCGGCCAAGCCGTGGAGGATCATATCCTTCTCACCCAC      255
+1: I G R A V G Q A V E D H I L L T H
DNA: GGCACGACACCATGGTTGAAACCGCCCGCTATCTTGGCGGCTTGCCCGAA      306
+1: G T D T M V E T A R Y L G G L P E
DNA: CTCGCCGGAAGACCGTGGTGTGAGCGGCGCGATGGTCCCCGGCCGGGTG      357
+1: L A G K T V V L S G A M V P G R V
DNA: GGGGGAAGCGACGCGGCTTCAATATCGGTTTCGCCTGCGCTGCGGCGTTG      408
+1: G G S D A A F N I G F A C A A A L
DNA: ATGCTGGCGCCGGGAGTCTATATTGCTATGCACGGCGAGGTTTTTCGACCCG      459
+1: M L A P G V Y I A M H G K V F D P
DNA: GCGAAAACCCGGAAGAATCGCGGCCTTGGCCGGTTCGAGCCCATCGACGAC      510
+1: A K T R K N R G L G R F E P I D D
DNA: CAGGAGTAG                                                    519
+1: Q E

```

Рисунок 1.

Ген и аминокислотная последовательность RrA.

Выделены замены в нуклеотидной последовательности по сравнению с геном нативной RrA.

# РЕКОМБИНАНТНАЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ L-АСПАРАГИНАЗА *R. RUBRUM*

*Экспрессия RrA.* В течение 10 ч роста после индукции активность в культуре наблюдалась только после разрушения клеток ультразвуком, что объясняется внутриклеточной локализацией RrA в полученном рекомбинантном штамме-продуcente. Активность культуры составляла до 25,3–27,3 МЕ/мл через 8,5–11,5 ч после внесения лактозы и 21,8–24,2 МЕ/мл через 10–13 ч после индукции IPTG. Через 11,5 ч культивирования начинался лизис клеток, о чём косвенно свидетельствовало снижение оптической плотности от максимальной 5,4–6,8 (для лактозы) и 5,7–6,0 (для IPTG) до 4,2–5,1 и 4,0–4,6 к концу выращивания соответственно. Лизис клеток сопровождался выходом фермента в периплазматическое пространство и среду культивирования. Активность фермента в культуре клеток без озвучивания — 13 МЕ/мл, продуктивность — 3,0 для обоих индукторов. Нарботка биомассы после индукции IPTG была более медленной. Максимальная продуктивность штамма при внесении лактозы или IPTG составила 5,4 (через 8,5 ч после индукции) и 4,9 (через 13 ч), соответственно.

*Очистка RrA.* Метод выделения фермента из клеток штамма-продуцента и его очистки, описанный в разделе “Методика”, включал ультразвуковую обработку суспензии клеток, удаление дебриса с помощью центрифугирования и две стадии ионообменной хроматографии на колонках с Q-Sepharose и DEAE-Toyopearl 650m. Результаты очистки фермента представлены в таблице 1. Как следует из таблицы 1, на первой стадии хроматографического разделения происходило удаление большей части балластных белков, и, хотя при этом терялось около 10% фермента, удельная активность возрастала в 3 раза. На последующих этапах очистки потерь активности фермента практически не происходило, в то время как удельная активность возрастала ещё в 2,5 раза.

Таблица 1. Результаты очистки RrA.

Стадия очистки	Общий белок, мг	Активность общая, МЕ	Удельная активность, МЕ/мг	Выход, %
Суспензия клеток		60000		100
Бесклеточный экстракт	10040	52200	5,2	87
Хроматография на Q-Sepharose	2610	45000	17,2	75
Хроматография на DEAE-Toyopearl 650m	1123	43800	39	73
Концентрирование	1088	43500	40	72,5

При электрофорезе очищенного препарата RrA в 12% Ds-Na-ПААГ выявлялась одна полоса в области 19-21 кДа (рис. 2). Данные электрофореза были обработаны с помощью программы Gel-Pro analyzer 3.1.00.00

(“Media Cybernetics”, США); по результатам расчётов степень очистки целевого фермента в полученном препарате составила 92%.

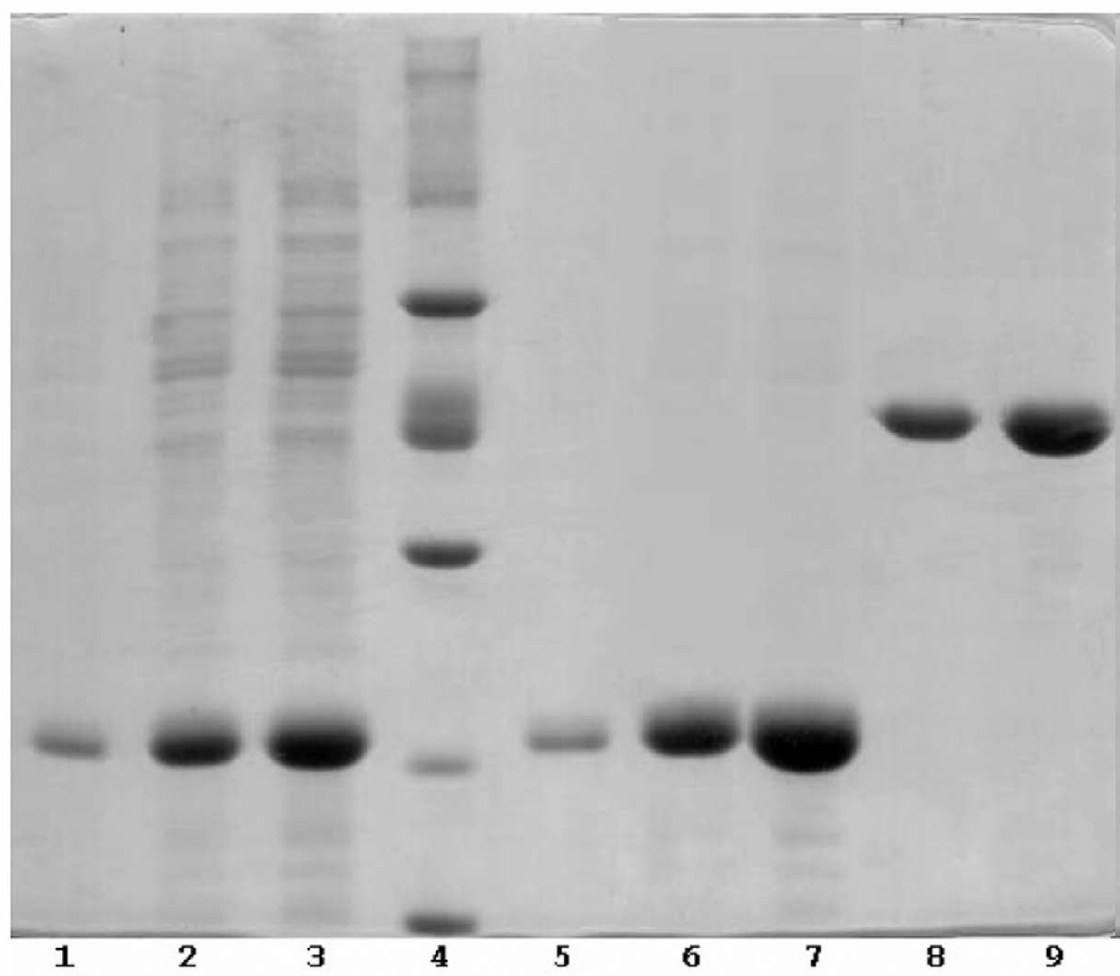


Рисунок 2.

Результаты электрофореза в 12% ПААГ-ДСН-На очищенного препарата RгА.

1-3 - RгА после УЗ обработки (30 МЕ/мл, в 1 мкл 24,5 мкг белка). 1, 3, 5 мкл.

4 - Молекулярные стандарты (Amersham #17-0446-01).

5-7 -RгА после очистки (608 МЕ/мл, в 1 мкл 10,96 мкг белка). 2, 5, 10 мкл.

8, 9 - ЕсА 0,5, 1 мкл.

*Изоэлектрическая точка* находится в пределах  $pH\ 5,1\pm0,3$ , что соответствует значению, рассчитанному теоретически, и несколько ниже  $pI$  аспарагиназы, выделенной из природного штамма, что объясняется заменой положительно заряженного Lys на отрицательно заряженную Glu.

*Зависимость активности от pH, температуры и ионной силы.* Оптимум pH фермента составил 9,2. При физиологических значениях  $pH\approx7,4$  активность RгА составляет 30–40% от максимальной и практически исчезает при  $pH=5,0$  (рис. 3). В отличие от ЕсА и ЕгА, активность RгА зависит от состава буферного раствора. Так, при использовании 0,1 М натрий-фосфатного буфера активность была примерно в 2 раза ниже, чем в 0,1 М натрий-ацетатном ( $pH\ 6,0$ ) и 0,05 М Трис-НСl ( $pH\ 7,0-8,0$ ) буферах, в 0,0125 М боратном буфере — на 30% ниже, чем в 0,05 М Трис-НСl ( $pH\ 9,0$ ).

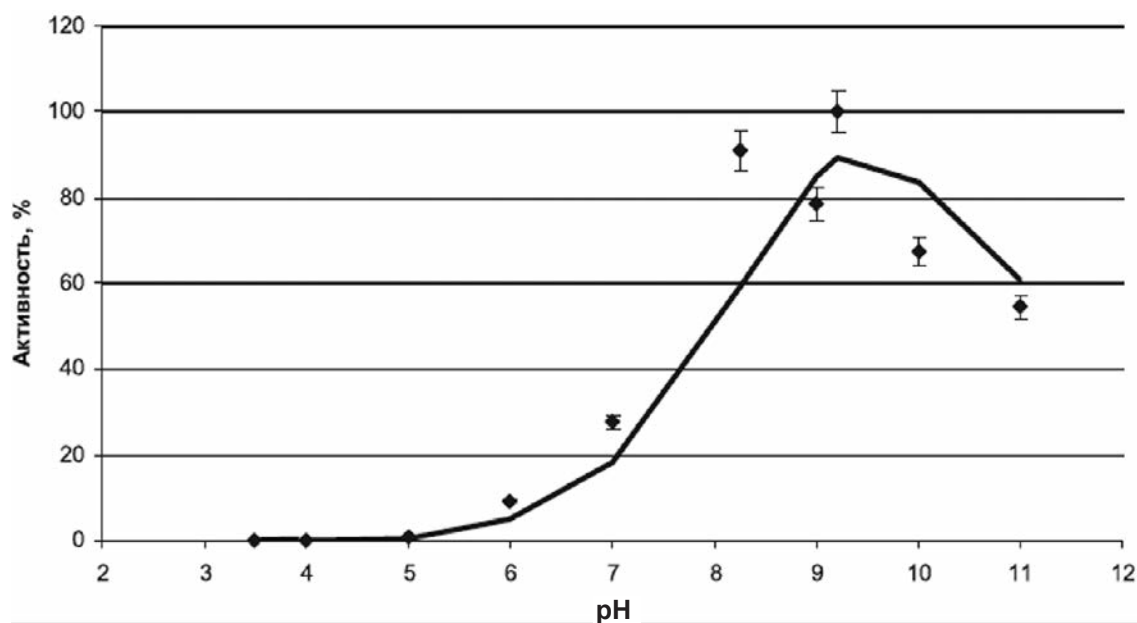


Рисунок 3.  
Зависимость активности RrA от pH.

RrA характеризуется температурным оптимумом действия при 54–55°C. При 36–37°C активность фермента составляет не менее 72% от максимальной. Зависимость активности фермента от температуры аналогична таковой для препаратов, применяемых в клинической практике [30].

Активность RrA максимальна при ионной силе в диапазоне концентрации KCl от 750 до 1250 мМ. Уменьшение ионной силы до 0,001 мМ приводит к снижению активности примерно на 30%, увеличение до 3000 мМ — к снижению более чем в 2 раза (рис. 4).

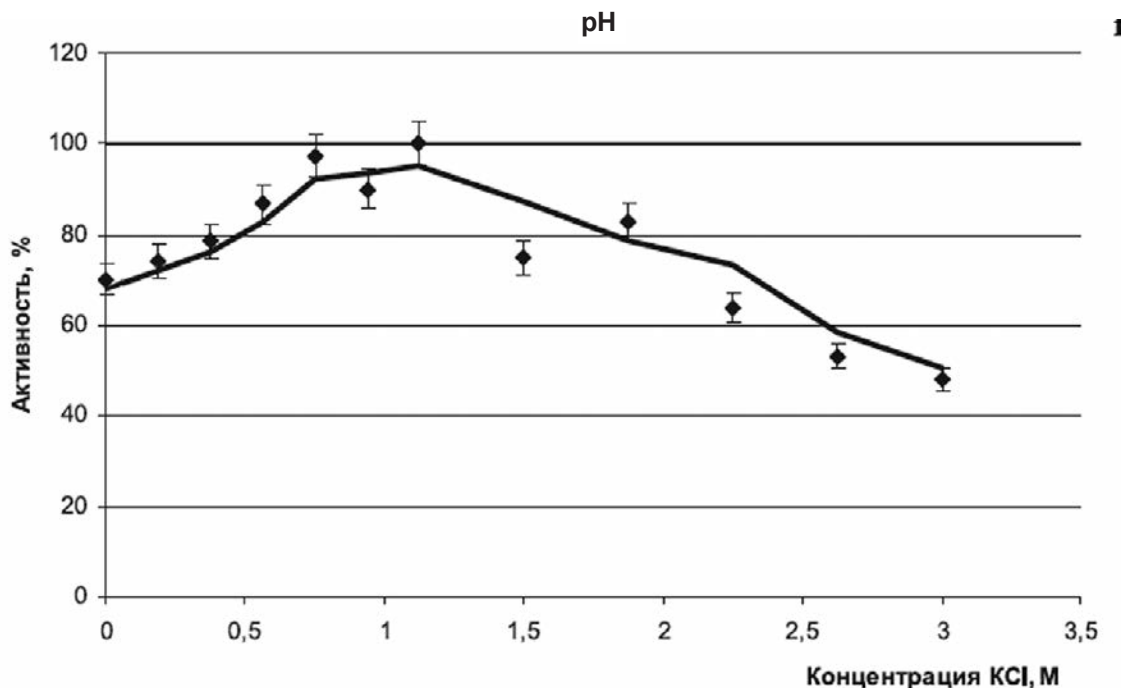
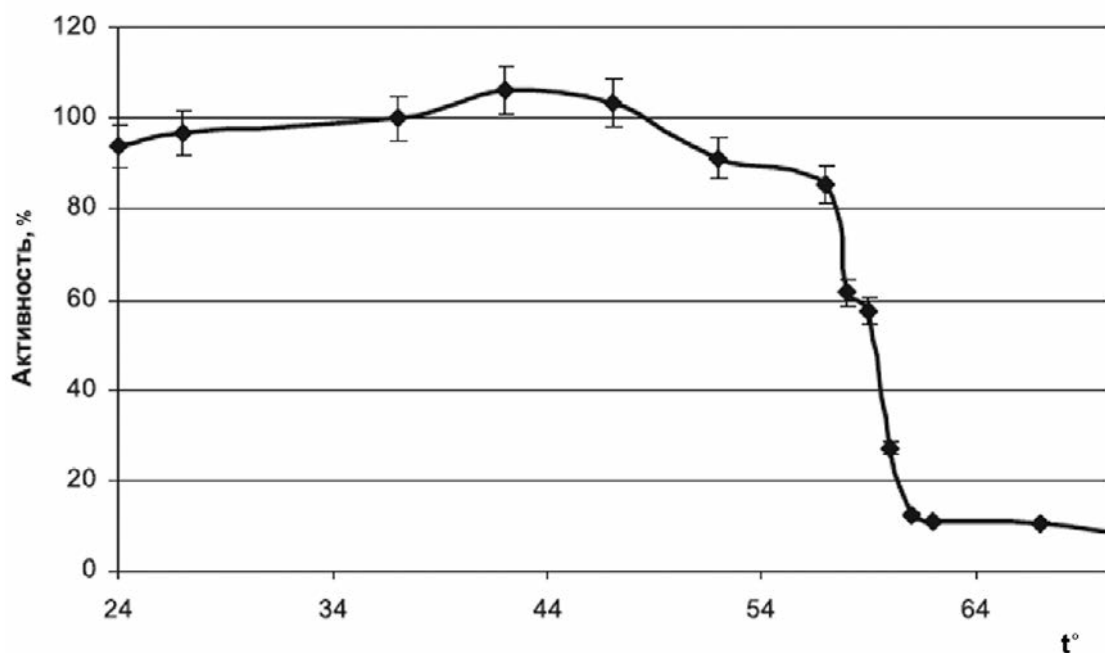


Рисунок 4.  
Зависимость активности RrA от ионной силы.



*Стабильность.* L-Аспарагиназная активность сохраняется на уровне >95% от начальной в течение 3 сут при инкубации в диапазоне температур от 4 до 37°C. При –70 –20°C в буфере (10 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 М глицин, 1 мМ ЭДТА, 0,28 М KCl и 0,5% глюкоза) активность RrA не снижается в течение 4 мес. Изучение термостабильности RrA показало, что резкое падение активности начинается при инкубации 3 мин при температуре выше 57°C. При инкубации в течение 3 мин при 60°C сохраняется 27% активности (рис. 5). При 80°C после инкубации в течение 10 мин активность снижается до 1% от исходной. Таким образом, незначительное превышение (на 2–3°C) температуры инкубации температурного оптимума действия фермента приводит к его инактивации.



**Рисунок 5.**  
Термостабильность RrA.

Инкубация RrA в течение 1 ч с 0–3 М мочевиной продемонстрировала несущественное снижение активности (сохраняется не менее 70% от исходной), дальнейшее повышение концентрации мочевины приводит к полной инактивации (рис. 6).

*Каталитические свойства.*  $K_m$  RrA для L-аспарагина составляет 0,22 мМ,  $V_{\text{макс.}} = 5,32$  мМ/мин,  $k_{\text{кат}} = 2,53$  с<sup>-1</sup>. Измеренная аналогичным образом  $K_m$  для ЕсА составила 0,017 мМ, что соответствует литературным данным [31].  $K_m$  для L-глутаминана аналогичным способом не определяется. При измерении L-глутаминазной активности методом прямой несслеризации, описанном в разделе “Методика”, было показано, что она составляет не более 0,1% от L-аспарагиназной, что достоверно не отличается от контрольных значений. Основные физико-химические и каталитические свойства RrA обобщены в таблице 2.

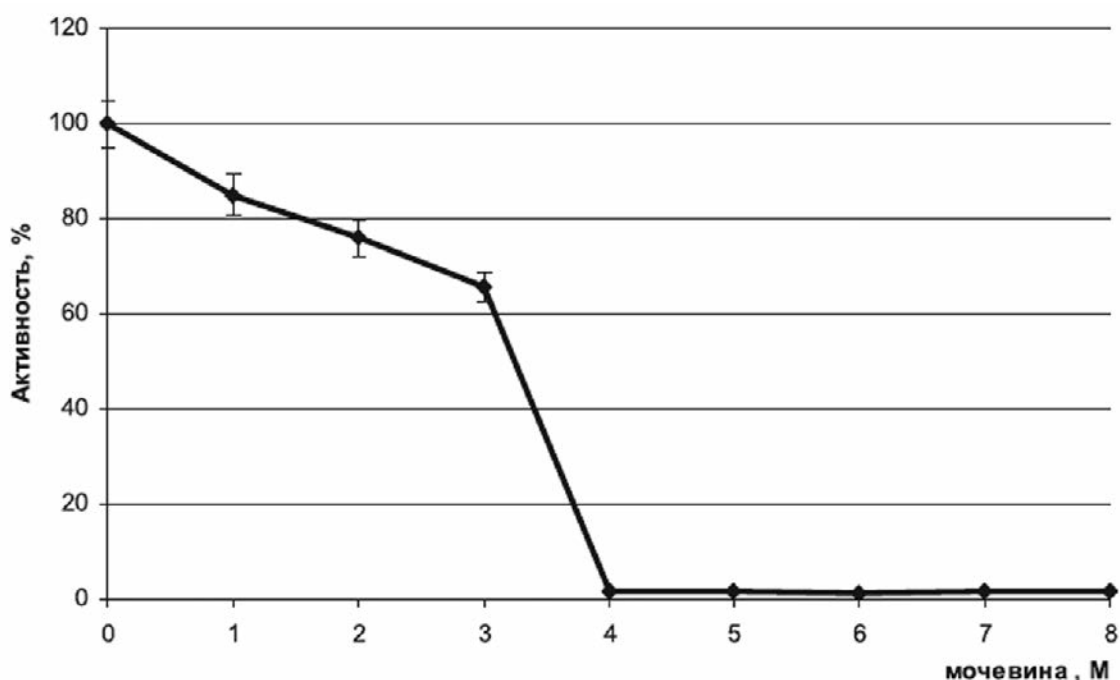
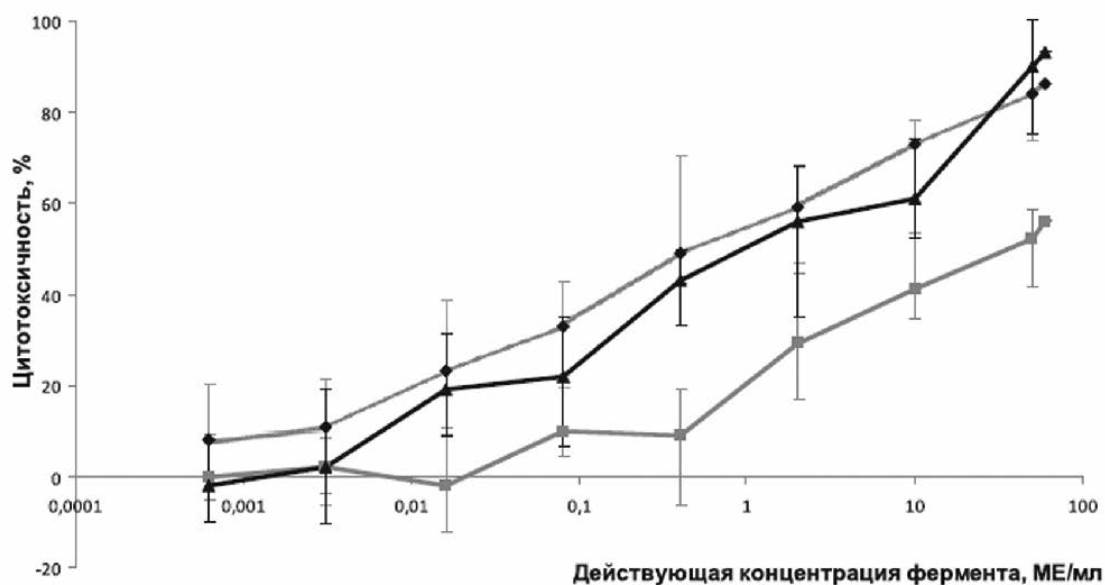


Рисунок 6.  
Стабильность RrA в растворе мочевины.

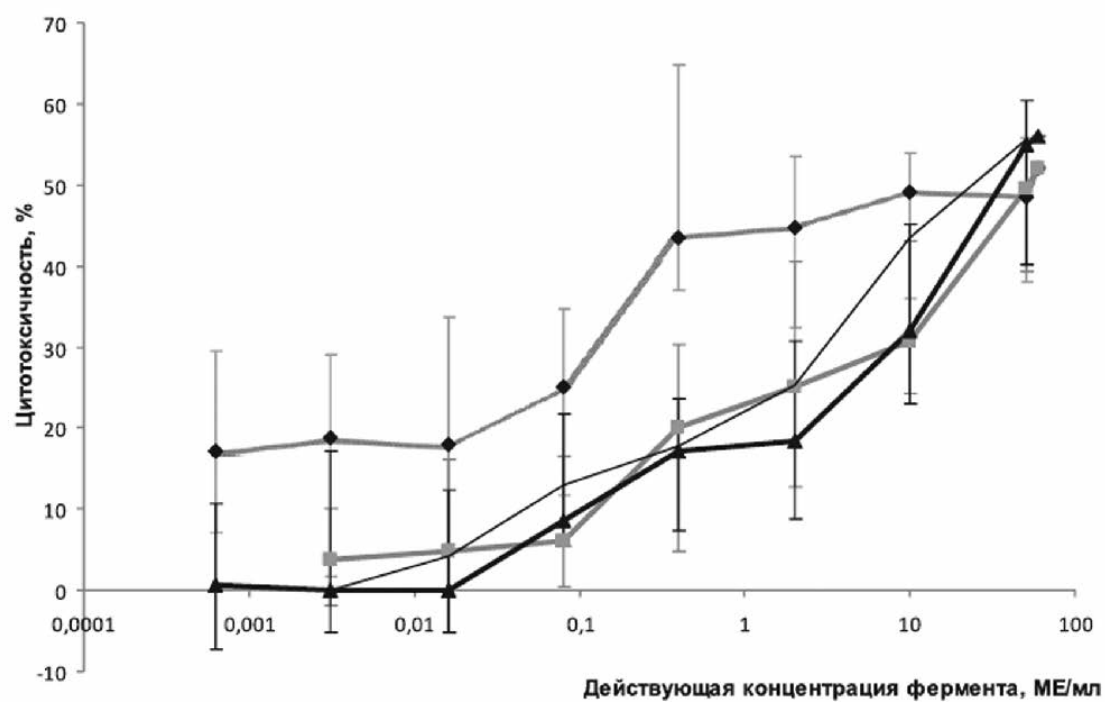
Таблица 2. Физико-химические свойства и кинетические параметры RrA и EcA.

Параметр	RrA	EcA
Молекулярная масса мономера, кДа	18,07	36,85
Число аминокислотных остатков	172	348
Оптимум pH	9,2	7,0–7,5
pI	5,1±0,3	5,0±0,2
$K_m$ для L-аспарагина, mM	0,22±0,01	0,017±0,001
L-глутаминазная активность, % от L-аспарагиназной	<0,1	≈5

**Цитотоксичность.** Значимый ( $p < 0,05$ ) цитотоксический эффект RrA выявлен на клеточных линиях K562 ( $IC_{50}=1,80$  МЕ/мл;  $C_{min}=0,016$  МЕ/мл), DU145 ( $IC_{50}=9,19$  МЕ/мл;  $C_{min}=0,08$  МЕ/мл), MDA-MB-231 ( $IC_{50}=34,62$  МЕ/мл;  $C_{min}=0,4$  МЕ/мл) и MCF7 ( $IC_{50}=43,3$  МЕ/мл;  $C_{min}=10$  МЕ/мл) (рис. 7). По критерию  $IC_{50}$  сравнительная цитотоксичность на этих клеточных линиях убывает в ряду  $EcA > RrA > EwA$  (табл. 3).



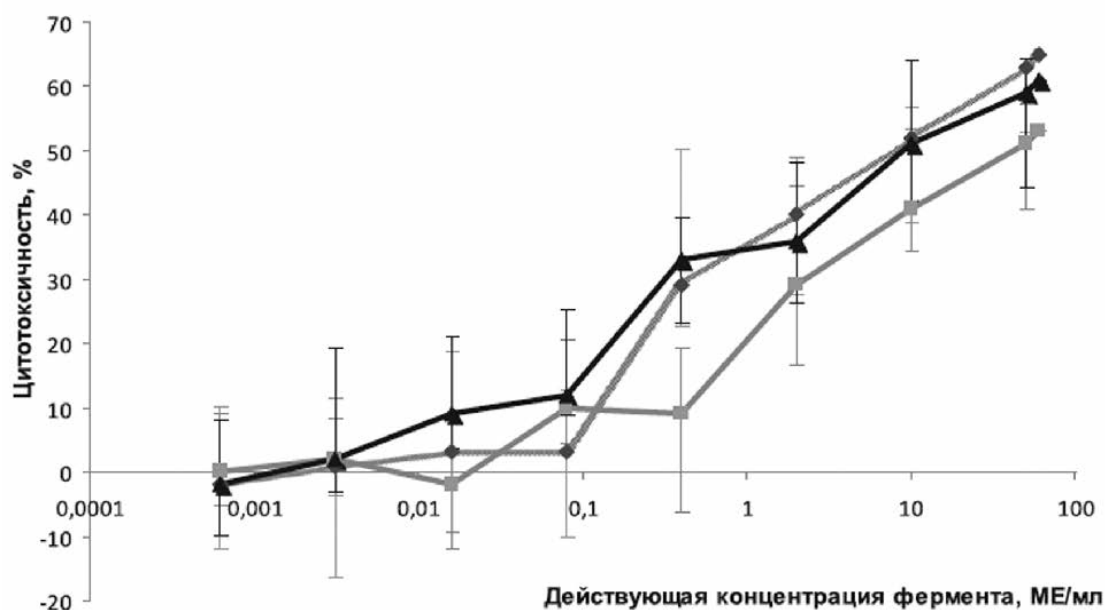
а



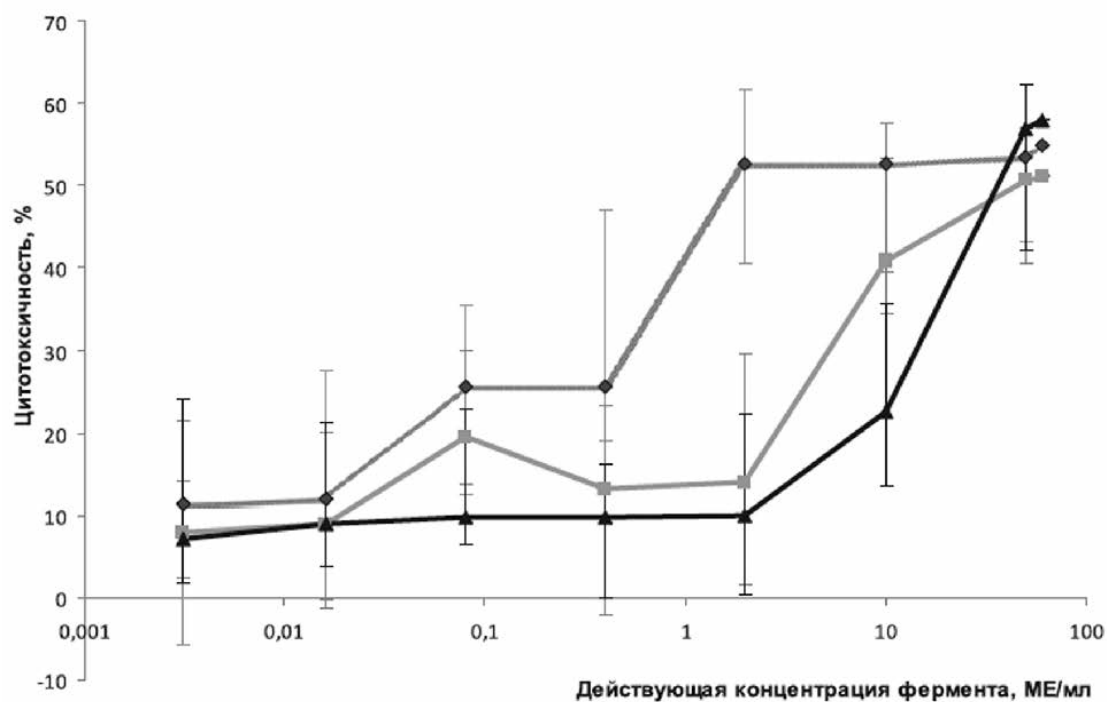
б

**Рисунок 7.**

Цитотоксичность RrA в сравнении с EсA на культурах клеток опухолей человека.  
 ▲ - RrA, ◆ - EсA, ■ - EwA (а - хронический миелолейкоз K562; б - рак молочной железы MDA-MB-231; в - рак предстательной железы DU145; г - рак молочной железы MCF-7).



В



Г

Рисунок 7 (продолжение).

Цитотоксичность RrA в сравнении с EсА на культурах клеток опухолей человека.  
 ▲ - RrA, ◆ - EсА, ■ - EwA (а - хронический миелолейкоз K562; б - рак молочной железы MDA-MB-231; в - рак предстательной железы DU145; г - рак молочной железы MCF-7).



Таблица 3. Значения  $IC_{50}$  RrA в сравнении с EcA и EwA на различных культурах клеток.

Линии опухолевых клеток	$IC_{50}, ME/ml$		
	EcA	EwA	RrA
MDA-MB-231	14,32	50,01	34,62
MCF7	10,94	35,06	43,30
DU145	2,33	19,61	9,19
K 562	0,82	11,06	1,80

**Противоопухолевая активность.** Показано, что RrA при 10-кратном введении в разовой дозе 4000 ME/кг значимо и достоверно продлевает жизнь мышей с L5178y: СПЖ=29,2±7,3 против 17,0±0,9 дней в контроле, Т/С=172% ( $p<0,05$ ) (рис. 8) с излечением 14% мышей без признаков опухолевого процесса на аутопсии. Переносимость лечения была удовлетворительной, гибели мышей от токсичности не отмечали.

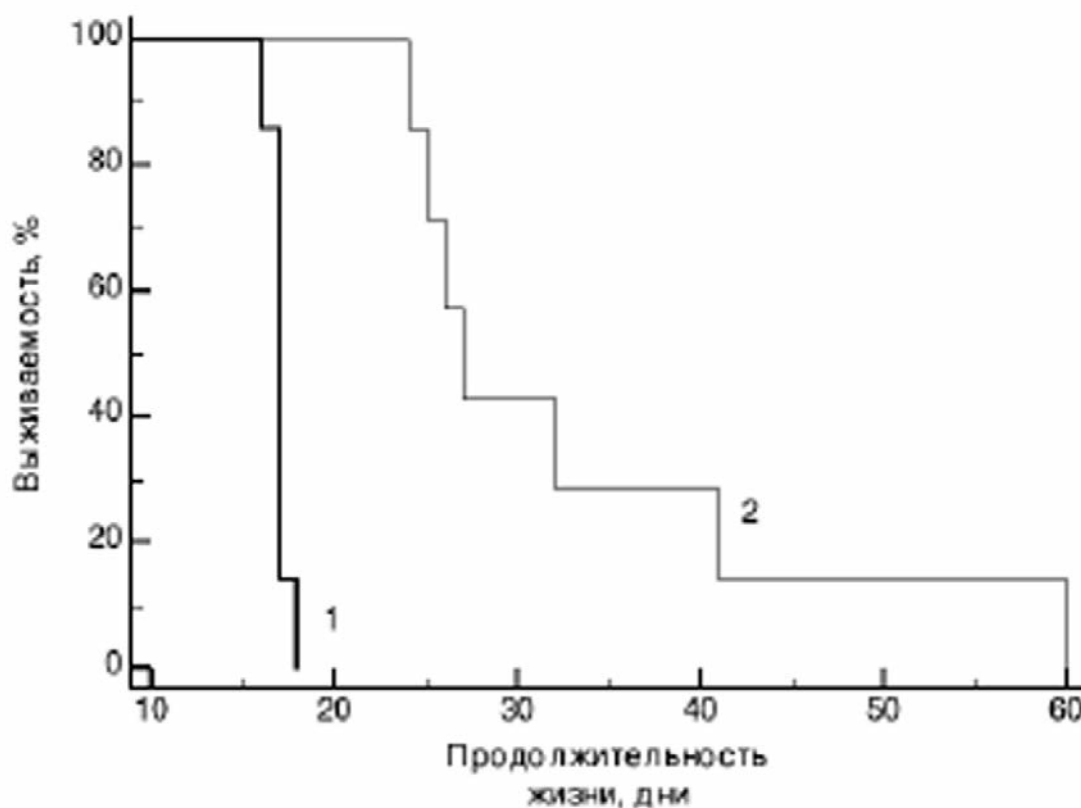


Рисунок 8.

Антипролиферативный эффект YpA *in vivo* на модели лимфаденоза Фишера L5178y.  
1 - контрольная группа, 2 - RrA.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** В ходе настоящей работы нами получен рекомбинантный штамм-продуцент внутриклеточной RrA, разработан способ очистки целевого белка и охарактеризованы основные физико-химические свойства и его антипролиферативный эффект. Выявленные свойства позволяют критически оценить качества нового фермента и его перспективность для дальнейшего изучения в онкологии.

Все бактериальные L-аспарагиназы в настоящее время принято разделять на два основных типа. К главным критериям их отличия относятся локализация (вне- или внутриклеточная), сродство к субстрату и четвертичная структура [32]. Принято считать, что L-аспарагиназы I типа представляют собой конститутивно экспрессирующиеся ферменты, локализованные в цитоплазме и характеризующиеся высокой  $K_m$  ( $10^{-3}$  М) для L-аспарагина. К L-аспарагиназам I типа относятся внутриклеточные L-аспарагиназы *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Methanococcus jannaschii*, *Pyrococcus horikoshii* и др. [33, 34]. Их  $K_m$  составляет около 3,5 мМ, и считается, что противоопухолевой активностью они не обладают [35, 36]. Бактериальные L-аспарагиназы II типа относятся к периплазматическим ферментам, имеют низкую  $K_m$  ( $10^{-5}$  М) для L-аспарагина и широкую субстратную специфичность [37]. L-аспарагиназы II типа включают применяемые в клинической онкологии EcA и ErA, а также практически все изученные L-аспарагиназы с доказанной антипролиферативной активностью.

Достаточно низкая  $K_m$  ( $0,22 \pm 0,01$  мМ), а также наличие достоверной антипролиферативной активности *in vitro* и *in vivo*, несмотря на внутриклеточную локализацию, не позволяет однозначно отнести RrA к бактериальным L-аспарагиназам I или II типа. Более того, существуют внутриклеточные ферменты, классифицированные как L-аспарагиназы II типа, например, из *Saccharomyces cerevisiae* [33]. По более жёстким критериям, предложенным D.T. Bonthron и M. Jaskolski, которые основаны на особенностях первичной структуры, RrA относится к L-аспарагиназам I типа, поскольку вместо высококонсервативной для L-аспарагиназ II типа последовательности <sup>122</sup>SADGP<sup>126</sup> (EcAII) содержит последовательность из трёх остатков <sup>122</sup>SDA<sup>124</sup> (RrA), характерную для L-аспарагиназ I типа [33]. Ещё одной особенностью рекомбинантной RrA, роднящей её с другими внутриклеточными L-аспарагиназами I типа, является крайне низкая L-глутаминазная активность. В противоположность существующим представлениям об отсутствии антипролиферативного эффекта у внутриклеточных L-аспарагиназ, результаты настоящего исследования позволяют утверждать, что некоторые внутриклеточные L-аспарагиназы независимо от таксономических характеристик все же проявляют антипролиферативное действие. Отсутствие такового у L-аспарагиназы *Pseudomonas geniculata* и L-глутаминазы-L-аспарагиназы *Pseudomonas acidovorans* может быть следствием неоптимальных условий применения (доза, кратность введения) или использования опухолевой модели с невысокой чувствительностью (лимфома Гарднера 6C3HED) [37–39]. Таким образом, выделенный фермент можно считать первой внутриклеточной L-аспарагиназой с установленной *in vivo* антипролиферативной активностью. К положительным характеристикам полученной нами RrA можно отнести короткую аминокислотную последовательность и крайне низкую L-глутаминазную активность, что позволяет предполагать относительно высокую избирательность специфического действия, определяющую перспективность нового фермента для онкологии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *van den Berg H.* (2011) *Leuk. Lymphoma*, **52**(2), 168–178.
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.* (2009) *Ann. Oncol.*, **20**, 110–116.
3. *Yong W., Zheng W., Zhang Y., Zhu J., Wei Y., Zhu D., Li J.* (2003) *Int. J. Hematol.*, **78**, 163–167.
4. *Obama K., Tara M., Niina K.* (1999) *Int. J. Hematol.*, **69**, 260–262.
5. *Agrawal N.R., Bukowski R.M., Rybicki L.A., Kurtzberg J., Cohen L.J., Hussein M.A.* (2003) *Cancer*, **98**, 94–99.
6. *Kobrinisky N.L., Sposto R., Shah N.R., Anderson J.R., DeLaat C., Morse M., Warkentin P., Gilchrist G.S., Cohen M.D., Shina D., Meadows A.T.* (2001) *J. Clin. Oncol.*, **19**, 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.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 31222–31233.
8. *Ollenschläger G., Roth E., Linkesch W., Jansen S., Simmel A., Mödder B.* (1988) *Eur. J. Clin. Invest.*, **18**, 512–516.
9. *Villa P., Corada M., Bartosek I.* (1986) *Toxicol. Lett.*, **32**, 235–241.
10. *Warrell R.P. Jr., Chou T.C., Gordon C., Tan C., Roberts J., Sternberg S.S., Philips F.S., Young C.W.* (1980) *Cancer Res.*, **40**, 4546–4551.
11. *Capizzy R.L., Cheng Y.C.* (1981) in: *Enzymes as drug* (Holcenberg J.S., Roberts J., eds.), John Wiley and Sons, N.Y., pp. 1–24.
12. *Storti E., Quaglino D.* (1970) in: *Experimental and clinical effects of L-asparaginase* (Grundmann, E., Oettgen, H.F., eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-N.Y., pp. 344–349.
13. *Bendich A., Kafkewitz D., Abuchowski A., Davis F.F.* (1982) *Clin. Exp. Immunol.*, **48**, 273–278.
14. *Distasio J.A., Salazar A.M., Nadji M., Durden D.L.* (1982) *Int. J. Cancer*, **30**, 343–347.
15. *Гладилина Ю.А., Соколов Н.Н., Красоткина Ю.В.* (2008) *Биомед. химия*, **54**, 482–486.
16. *Cappelletty D., Chiarelli L.R., Pasquetto M.V., Stivala S., Valentini G., Scotti C.* (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **377**, 1222–1226.
17. *Ghosh R., Hardmeyer A., Thoenen I., Bachofen R.* (1994) *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1698–1700.
18. *Neilson A.H., Nordlund S.* (1975) *J. Gen. Microbiol.*, **91**, 53–62.
19. *Sambrook J., Russell D.W.* (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y.
20. *Покровская М.В., Покровский В.С., Соколов Н.Н.* (2011) *Прикладная биохимия и микробиология*, **47**, 183–186.
21. *Hartree E.F.* (1991) *Anal. Biochem.*, **192**, 215–218.
22. *Остерман Л.А.* (1983) *Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами*, Наука, Москва.
23. *Борисова А.А., Эльдаров М.А., Жгун А.А., Александрова С.С., Омельянюк Н.М., Соков Б.Н., Березов Т.Т., Соколов Н.Н.* (2003) *Биомед. химия*, **49**, 502–507.
24. *Wade H.E., Philips B.P.* (1971) *Anal. Biochem.*, **72**, 248.

25. *Wriston J.C., Yellin T.O.* (1985) *Adv. Enzymol.*, **39**, 185-248.
26. *Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К.* (1991) Справочник биохимика, Мир, Москва.
27. *Mossman T.* (1983) *J. Immunol. Methods*, **65**, 55–63.
28. *Трещалина Е.М.* (2005) Противоопухолевая активность веществ природного происхождения, Практическая медицина, Москва.
29. *Chabner B.A., Longo D.L.* (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*, Lippincott-Raven, Philadelphia.
30. *Peng G., Fritzsche G., Zickermann V., Schägger H., Mentele R., Lottspeich F., Bostina M., Radermacher M., Huber R., Stetter K.O., Michel H.* (2003) *Biochemistry*, **42**, 3032–3039.
31. *Derst C., Henseling J., Röhm K.H.* (2000) *Protein Science*, **9**, 2009–2017.
32. *Michalska K., Jaskolski M.* (2006) *Acta Biochim. Pol.*, **53**, 627-640.
33. *Bonthron D.T., Jaskolski M.* (1997) *Acta Biochim. Pol.*, **44**, 491-504.
34. *Yao M., Yasutake Y., Morita H., Tanaka I.* (2005) *Acta Crystallogr.*, **61**, 294-301.
35. *Campbell H.A., Mashburn L.T., Boyse E.A., Old L.J.* (1967) *Biochemistry*, **6**, 721–730.
36. *Schwartz J.H., Reeves J.Y., Broome J.D.* (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **56**, 1516–1519.
37. *Yun M.K., Nourse A., White S.W., Rock C.O., Heath R.J.* (2007) *J. Mol. Biol.*, **369**, 794–811.
38. *Kitto G.B., Smith G., Thiet T., Mason M., Davidson L.* (1979) *J. Bacteriol.*, **137**, 204–212.
39. *Davidson L., Brear D.R., Wingard P., Hawkins J., Kitto G.B.* (1977) *J. Bacteriol.*, **129**, 1379–1386.

Поступила: 01. 06. 2011.



**RECOMBINANT INTRACELLULAR RHODOSPIRILLUM RUBRUM  
L-ASPARAGINASE WITH LOW L-GLUTAMINASE ACTIVITY  
AND ANTIPROLIFERATIVE EFFECT**

*M.V. Pokrovskaya<sup>1</sup>, V.S. Pokrovskiy<sup>1,2</sup>, S.S. Aleksandrova<sup>1</sup>, N.Yu. Anisimova<sup>2</sup>, R.M. Andrianov<sup>3</sup>,  
E.M. Treschalina<sup>2</sup>, G.V. Ponomarev<sup>1</sup>, N.N. Sokolov<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry of Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya, 10,  
Moscow, 119121 Russia; e-mail: vadimpokrovsky@yandex.ru

<sup>2</sup>N.N. Blokhin Cancer Research Center of Russian Academy of Medical Sciences,  
Kashirskoye shosse, 24, Moscow, 115478 Russia

<sup>3</sup>A.N. Bach Institute of biochemistry of Russian Academy of Sciences, Leninsky prospekt, 33, str. 2,  
Moscow, 119071, Russia

The recombinant producer of *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase (RrA) was received and purification procedure of RrA was developed. It was shown that RrA has following biochemical and catalytic characteristics:  $K_m$  for L-asn 0,22 mM, pH optimum 9,2; temperature optimum 54°C; pI=5,1±0,3; L-gln activity seems to be low-to-negligible. K562, DU145 and MDA-MB-231 cellular lines displayed significant sensitivity towards the enzyme (IC<sub>50</sub>=1,80; 9,19 and 34,62 ME/ml, respectively). In comparison with L-asparaginases from *E. coli* II type (EcA) and *Erwinia carotovora* (EwA) cytotoxicity of RrA seems to be higher than EwA, but lower than EcA. 10-fold i.p. RrA administration (4000 ME/kg per day) in L5178y bearing mice showed T/C=172%. The received results show that RrA belongs to I type cellular L-asparaginases with low L-gln activity and the high antiproliferative effect.

**Key words:** *Rhodospirillum rubrum*, intracellular L-asparaginase, antiproliferative activity.