

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.151; 579.66

©Коллектив авторов

РЕКОМБИНАНТНАЯ СИНТЕТАЗА ЦЕФАЛОСПОРИНОВ-КИСЛОТ: ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ В КЛЕТКАХ *E. COLI*, ИММОБИЛИЗАЦИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО СИНТЕЗА ЦЕФАЗОЛИНА

**М.А. Эльдаров¹, А.В. Скляренок^{2*}, М.В. Думина¹, Н.В. Медведева², А.А. Жгун¹,
Д.Э. Сатарова², А.И. Сидоренко², А.С. Епремян³, С.В. Яроцкий²**

¹Центр “Биоинженерия” РАН,
117312, Москва, пр. 60-летия Октября, д. 7, корп. 1;
тел.: 8(499)1356219; эл. почта: meldarov@mail.ru

²Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов,
117545, Москва, 1-ый Дорожный пр-д, д. 1; тел.: 8 (495) 3150465;
эл. почта: asklyarenko@yandex.ru

³Научно-производственный центр “Армбиотехнология” Национальной академии наук
Армении, Армения, 0056, Ереван, Нор Норка, 3-й микрорайон, ул. Гюрджян, д. 14

Синтетаза цефалоспоринов-кислот (cephalosporin-acid synthetase, CASA) специфична к синтезу цефалоспоринов-кислот; продукция этого фермента в клетках *Escherichia coli* сопровождается накоплением непротрансформированного нерастворимого предшественника.

Для оптимизации условий продукции рекомбинантной CASA изучали эффекты таких параметров культивирования штамма-продуцента как состав питательной среды, посевная доза, температура культивирования. Для совершенствования вектора экспрессии CASA были созданы дополнительные конструкции для продукции варианта CASA с сигнальной последовательностью L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* (ansCASA) и “безлидерного” варианта CASA.

Удаление N-концевой сигнальной последовательности на порядок снижало уровень продукции функционально активной CASA и подавляло рост штамма. Введение сигнальной последовательности L-аспарагиназы повышало удельную активность фермента в полученном штамме. С использованием продуцента ansCASA разработан метод иммобилизации рекомбинантного фермента на макропористом акрилатном носителе, содержащем активные эпоксигруппы. Полученный биокатализатор обеспечивал высокоэффективный синтез цефазолина (ЦЕЗ) из 3-[(5-метил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-тиометил]-7-аминоцефалоспориновой кислоты (ММТД-7-АЦК) и метилового эфира 1(Н)-тетразолилуксусной кислоты (МЭТЗУК), в мягких условиях достигнута степень трансформации ММТД-7-АЦК в ЦЕЗ 95%.

Ключевые слова: рекомбинантные ферменты, оптимизация экспрессии, синтетаза цефалоспоринов-кислот, антибиотики, цефазолин, биокаталитический синтез

DOI: 10.18097/PBMC20156105646

ВВЕДЕНИЕ

Полусинтетические пенициллины и цефалоспорины относятся к важному классу бета-лактамов антибиотиков; на их долю приходится 65% общего мирового рынка антибиотиков [1, 2].

Разработка биокаталитических технологий получения этих и других бета-лактамов антибиотиков является перспективной альтернативой традиционному химическому синтезу [3].

Фермент синтетаза цефалоспоринов-кислот (cephalosporin-acid synthetase, CASA) осуществляет синтез цефалоспоринов-кислот, катализируя реакцию ацилирования аминогруппы ключевой аминокислоты, несущей β-лактамовое ядро антибиотика, соответствующей карбоновой кислотой, содержащей боковую цепь антибиотика. CASA продуцируется различными штаммами *E. coli*, в том числе штаммом *E. coli* ВКПМ В-10182 [4].

* - адресат для переписки

Ген CASA был идентифицирован нами в составе расшифрованной геномной последовательности штамма ВКПМ В-11082 как прямой гомолог пенициллин-G-ацилазы *E. coli* (ECOPGA), создан рекомбинантный штамм *E. coli* – продуцент CASA, эффективно экспрессирующий ген CASA под контролем T7-промотора [5]. В созданной системе экспрессии значительное количество рекомбинантного фермента всё же находилось в составе нерастворимого непротестированного предшественника, что является достаточно типичным для систем продукции рекомбинантных PGA [6].

Цель настоящей работы – оптимизация условий биосинтеза CASA в клетках *E. coli* с использованием микробиологических и генно-инженерных подходов, получение биокатализатора на основе рекомбинантной CASA и разработка метода биокаталитической трансформации субстратов в ЦЕЗ с использованием такого биокатализатора.

МЕТОДИКА

Штаммы микроорганизмов

Штамм *E. coli* ВКПМ В-12206 является трансформантом штамма *E. coli* BL21 (DE3) плазмидой pMD0107, содержащей ген CASA под контролем промотора фага T7. Для конструирования вариантов вектора pMD0107 использовали штамм *E. coli* XL1Blue (“Stratagene”, США). Экспрессию вариантов CASA осуществляли в штамме *E. coli* BL21 (DE3) [7].

Манипуляции с ДНК и компьютерные программы

Варианты гена CASA с заменами в области N-концевой кодирующей последовательности получали методами обычной и “рекомбинантной” ПЦР с последующим субклонированием. Для проведения сайт-направленного мутагенеза использовали процедуру Quick-Change и высокоточную полимеразу Phuzion (“New England Biolabs”, США). Вставки гена CASA в полученных конструкциях секвенировали для исключения возможных неспецифических ПЦР-ошибок.

Конструирование плазмид pMD704 и pMD705 для экспрессии вариантов гена CASA с заменами и модификациями в области N-концевой кодирующей последовательности проводили, как описано в Приложении 1. Для визуализации и анализа последовательностей использовали пакет программ Vector NTI8 “Life Technologies”, США) [8].

Культивирование штаммов

Биосинтез CASA в полученных трансформантах штамма *E. coli* BL21(DE3) осуществляли путём их культивирования в условиях “автоиндукции” [9]. Для вариации значимых для культивирования параметров питательной среды подбирали концентрации источников углерода (глюкоза, глицерин), азота (сульфат аммония), микронутриентов (сульфат магния), оставляя концентрацию других компонентов неизменной.

Пенициллинамидазную и синтетазную активность исследуемых образцов определяли как описано в Приложении 1.

Получение ферментных препаратов

Частично очищенные препараты рекомбинантной CASA получали путём гомогенизации полученной биомассы высоким давлением, осаждения белков из бесклеточных экстрактов ПЕГ6000, растворения осадка в подходящем объёме буфера. Биокатализаторы (БК) на основе CASA получали путём иммобилизации фермента на макропористом носителе акрилатной природы Relizyme EP113/S (Приложение 1).

Для синтеза ЦЕЗ из 3-[(5-метил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-тиометил]-7-аминоцефалоспоровой кислоты (ММТД-7-АЦК) и метилового эфира 1(Н)-тетразолил-уксусной кислоты (МЭТЗУК) использовали образец БК с синтетазной активностью 240 МЕ/г влажного БК. Динамику синтеза контролировали как описано в Приложении 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оптимизации продукции CASA в клетках *E. coli* мы предприняли комплексный подход, заключающийся как в более тщательном подборе условий культивирования ранее созданного штамма, так и в создании дополнительных конструкций для экспрессии вариантов CASA с заменами в области N-концевой сигнальной последовательности – ansCASA и LL-CASA.

CASA (PGA) – периплазматический фермент, созревание и сборка которого сопряжены с процессом транслокации предшественника через внутреннюю плазматическую мембрану с использованием Sec-систем хозяйского штамма *E. coli* [11]. Природная сигнальная последовательность PGA содержит сдвоенные остатки аргинина и обеспечивает перенос этого белка при помощи TAT-системы транслокации [12]. Более эффективной по сравнению с TAT-системой является “классическая” SecB-зависимая система транслокации [13]. Для “переадресации” синтезируемой CASA в SecB-зависимую систему транслокации мы провели замену собственной сигнальной последовательности CASA на сигнальный пептид SIGANS в составе кодирующей последовательности гена CASA в векторе pMD0107 – ansCASA.

Выбор SIGANS в качестве N-концевой экспортирующей последовательности был обусловлен тем, что эта последовательность является типичным secB-зависимым сигнальным пептидом; она способна эффективно направлять экспорт тетрамера ECAR-LANS в периплазму рекомбинантных штаммов *E. coli* – продуцентов аспарагиназы, и, в отличие от природной сигнальной последовательности CASA, не содержит аминокислотных остатков с объёмными боковыми группами [14].

Родственными PGA являются глутарилацилазы (GLA) – ферменты биотрансформации цефалоспоринов

в 7-АЦК. Показано, что “цитоплазматическая” экспрессия варианта GLA *Brevundimonas diminuta* с удалённой собственной сигнальной последовательностью не препятствует правильному созреванию и фолдингу функционально активного фермента и существенно улучшает параметры роста штамма-продуцента и уровень продукции GLA [15].

Для проверки возможности создания эффективной системы “цитоплазматической” продукции CASA мы провели конструирование вектора для экспрессии варианта CASA с удалённым сигнальным пептидом – LL-CASA.

Полученные плазмиды pMD704 и pMD705 трансформировали в штамм *E. coli* BL21(DE3), трансформанты культивировали как описано в разделе “Методика”, определяя в полученных образцах плотность культуры и пенициллин-амидазную активность.

Удаление сигнальной последовательности секреции на порядок снижало уровень продукции функционально активной CASA и подавляет рост штамма. В то же время, введение сигнальной последовательности ECAR-LANS несколько повышало удельную активность CASA (примерно на 10% по сравнению с вариантом “дикого типа”, рис. 1).

За счёт подбора оптимальных концентраций глюкозы, глицерина и магния, снижения pH и оптимальной температуры удалось на 20-25%

поднять уровень продукции CASA в полученном штамме *E. coli* BL21(DE3)/pMD704 – до 6,5 МЕ/мл.

Экстракты CASA из полученной биомассы иммобилизовали на Relizyme EP113/S, варьируя такие параметры, как ионная сила и pH буфера, нагрузка фермента на носитель, тип блокирующего реагента. В оптимальных условиях, при использованной нагрузке синтетазной активности на носитель 755 МЕ/г сухих веществ инкубация фермента с носителем в 1,25 М фосфатно-калиевом буфере с pH 8,0 в течение 70-142 ч позволяет получить БК с активностью более 160 МЕ/г влажн. и выходом активности более 60%.

Полученный БК использовали для кинетически контролируемого синтеза ЦЕЗ. Помимо синтеза целевого антибиотика CASA катализирует две побочные гидролитические реакции: гидролиза ациламидной связи ЦЕЗ с образованием ММТД-7-АЦК и свободной ТЗУК, а также гидролиза сложноэфирной связи МЭТЗУК. Степень трансформации ММТД-7-АЦК в цефазолин определяется соотношением скоростей целевой синтетазной и побочных гидролитических реакций [14, 15]. Динамика изменения состава реакционной смеси представлена на рисунке 2А, где концентрации цефазолина и ММТД-7-АЦК (в %) рассчитаны относительно исходной концентрации ключевой аминокислоты (C_{KA}^0 , mM), а концентрации МЭТЗУК и ТЗУК (в %) – относительно исходной концентрации ацилирующего агента (C_{AA}^0 , mM).

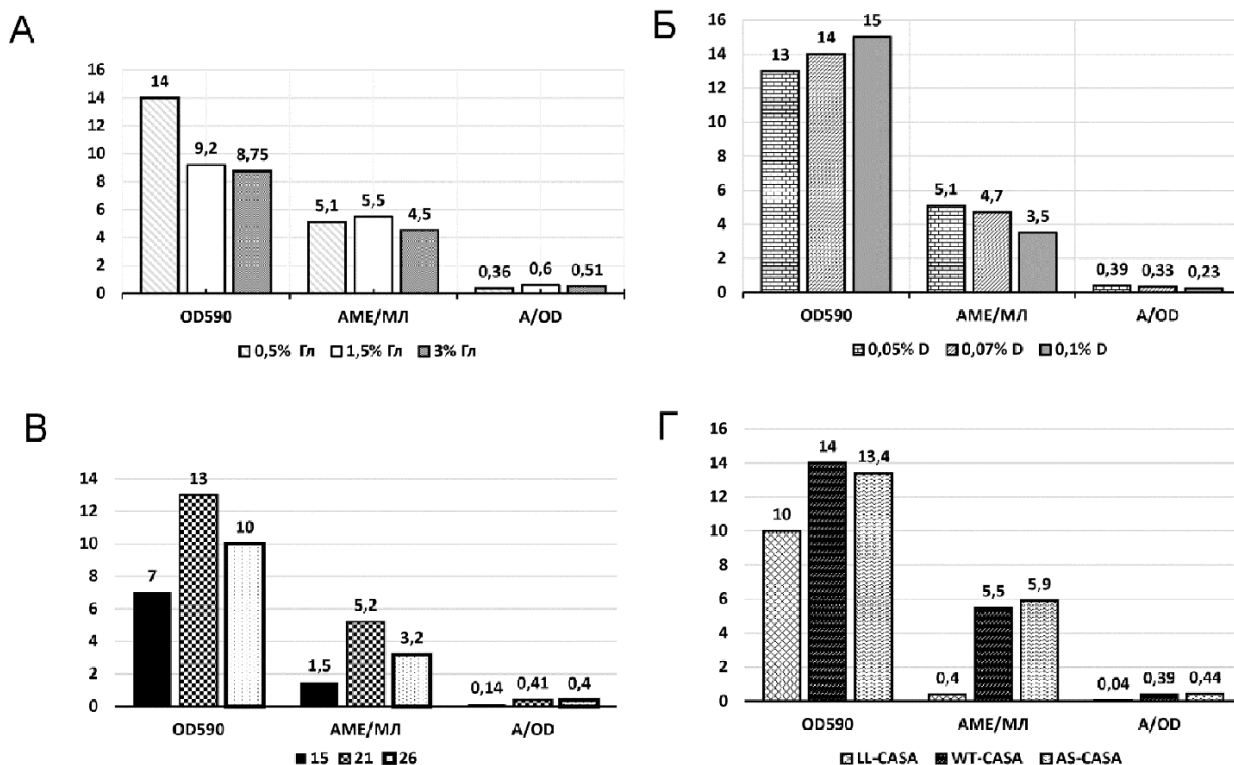


Рисунок 1. Оптимизация экспрессии CASA. Влияние концентрации глицерина (А - 0,5%, 1,5%, 3%), глюкозы (Б - 0,05%, 0,07%, 0,1%), температуры культивирования (В - 15°C, 21°C, 26°C) и конструкции вектора (Г - LL-CASA - “безлидерный” вариант, WT-CASA - собственный сигнальный пептид CASA, AS-CASA - рго-часть CASA с сигнальным пептидом L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*) на рост штамма (OD590), накопление пенициллинамидазной активности (А, МЕ/мл) и удельную активность (А/OD).

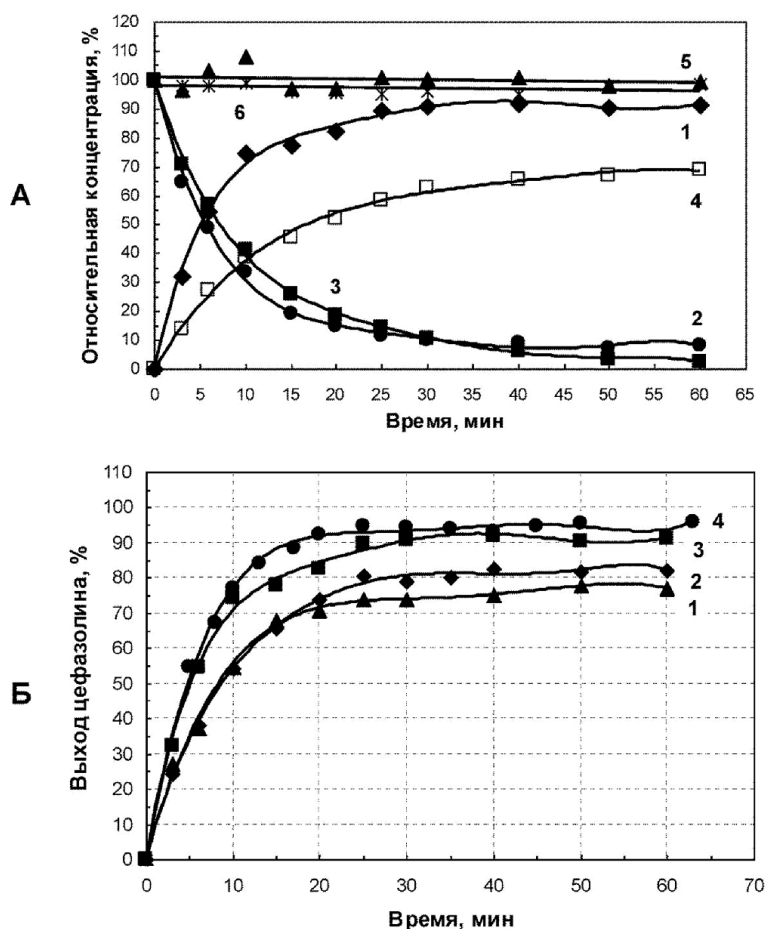


Рисунок 2. Синтез ЦЕЗ с помощью БК на основе рекомбинантной ansCASA.

А. Динамика изменения состава реакционной смеси. Условия: 30°C; 0,3 М фосфатно-натриевый буфер; спонтанный градиент pH 7,5>6,0; $C_E=9,6$ МЕ/мл; $C_{KA}^0=60$ мМ; $C_{AA}^0=235$ мМ; $X^0=3,9$ М/М.

1 (ромбы) - цефазолин; 2 (кружки) - ММТД-7-АЦК; 3 (полные квадраты) - МЭТЗУК; 4 (пустые квадраты) - ТЗУК; 5 (треугольники) - баланс по β -лактаму; 6 (звездочки) - баланс по ТЗУК.

Б. Динамика накопления ЦЕЗ в реакционной смеси в зависимости от исходного мольного избытка ацилирующего агента над ключевой аминокислотой. Условия: 30°C; 0,3 М фосфатно-натриевый буфер; спонтанный градиент pH 7,5>6,0; $C_E=9,6$ МЕ/мл; $C_{KA}^0=60$ мМ.

1 (треугольники) - $X^0=2,4$ М/М; 2 (ромбы) - $X^0=3,4$ М/М; 3 (квадраты) - $X^0=3,9$ М/М; 4 (кружки) - $X^0=4,7$ М/М.

В условиях эксперимента при исходном мольном избытке МЭТЗУК над ММТД-7-АЦК – $X^0=3,9$ М/М степень трансформации ММТД-7-АЦК в ЦЕЗ достигает 90%, причём кривая накопления ЦЕЗ характеризуется продолжительным плато, что свидетельствует о существенном превышении скорости синтеза ЦЕЗ над скоростью его гидролиза. Полученные данные как по содержащим β -лактам соединениям (ММТД-7-АЦК и ЦЕЗ) так и по соединениям, содержащим остаток ТЗУК (МЭТЗУК, цефазолин, ТЗУК), свидетельствуют об отсутствии неконтролируемых побочных процессов.

Повышение эффективности кинетически контролируемого синтеза ЦЕЗ возможно путём увеличения исходного мольного избытка ацилирующего агента над ключевой аминокислотой [16]. Кривые накопления ЦЕЗ с использованием исходной концентрации ММТД-7-АЦК $C_{KA}^0=60$ мМ

(около 20 мг/мл) и различных исходных мольных избытков X^0 представлены на рисунке 2Б. В условиях эксперимента нагрузка по ферментативной активности $C_E=9,6$ МЕ/мл обеспечивает достижение максимального выхода ЦЕЗ за 25-30 мин. Двукратное повышение исходного мольного избытка МЭТЗУК над ММТД-7-АЦК приводит к увеличению максимального достигаемого выхода ЦЕЗ от 77% до 95%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Для эффективного процессинга и фолдинга функционально-активной CASA в *E. coli* необходимо присутствие N-концевой сигнальной последовательности. Пример повышенной экспрессии варианта CASA с SIGANS указывает на возможность дальнейшей оптимизации продукции CASA за счёт удачного выбора сигнального пептида. Вопрос о том,

почему CASA, в отличие от GLA, не способна подвергаться эффективному процессингу в цитоплазме рекомбинантных штаммов-продуцентов, остаётся открытым. Это может быть связано как с наличием локализованных в периплазме необходимых кофакторов созревания и фолдинга зрелой CASA, так и с сопряженностью этих процессов с процессом транслокации rprgroCASA из цитоплазмы в периплазму клеток штамма-продуцента.

Разработан метод получения БК на основе CASA в технологически удобной форме иммобилизованного фермента. Созданные БК обеспечивают эффективный синтез ЦЕЗ с выходом 77-95% от соответствующей ключевой аминокислоты, в зависимости от исходного мольного избытка ацилирующего агента. Дальнейшие исследования будут направлены на оптимизацию условий биокаталитического синтеза ЦЕЗ с целью снижения мольного избытка ацилирующего агента при сохранении высокого выхода антибиотика, а также на изучение специфичности фермента и разработку процессов синтеза других цефалоспоринов-кислот.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ – Соглашение о предоставлении субсидии №14.604.21.0022 от 17.06.2014, уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60414X0022.

Авторы выражают благодарность Н.Н. Соколову (Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича) за плодотворную дискуссию.

Дополнительные материалы (Приложение 1) свободно доступны в электронной версии статьи на сайте журнала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Elander R.P. (2003) Appl. Microbiol. Biotechnol., **61**, 385-392.
2. Ныс П.С., Курочкина В.Б., Скляренко А.В., Вейнберг Г.А. (2000) Антибиот. химиотер., **45**(11), 36-42.
3. Sklyarenko A.V., Kurochkina V.B., Egorov A.M. (2006) In: New research on biotechnology in biology and medicine (Egorov A.M., Zaikov G., eds), Nova Science Publishers, pp. 73-86.
4. Скляренко А.В., Курочкина В.Б., Сатарова Д.Э., Крестьянова И.Н., Яроцкий С.В., Джианг Й., Занг К., Ху Ю., Джа А., Жу Л., Ксионг Х. (2010) Патент на изобретение РФ № 2420581 от 29.01.2010. Бюлл. изобр. №16, год 10.06.2011.
5. Эльдаров М.А., Скляренко А.В., Марданов А.В., Белецкий А.В., Жгун А.А., Думина М.В., Медведева Н.В., Сатарова Д.Э., Равин Н.В., Яроцкий С.В. (2015) Прикл. биохим. микробиол., **51**(5) в печати.
6. Tishkov V.I., Savin S.S., Yasnaya A.S. (2010) Acta Naturae, **2**, 47-61.
7. pET vector Expression System Manual, 11th Edition protocols and methods [<http://biowww.net/detail-1328.html>]
8. Lu G., Moriyama E.N. (2004) Brief. Bioinform., **5**, 378-388.
9. Studier F.W. (2005) Protein Expr. Purif., **41**, 207-234.
10. Balasingham K., Warburton D., Dunnill P., Lilly M.D. (1972) Biochim. Biophys. Acta - Enzymol., **276**, 250-256.
11. Ignatova Z., Mahsunah A., Georgieva M., Kasche V. (2003) Appl. Environ. Microbiol., **69**, 1237-1245.
12. Ignatova Z., Hörnle C., Nurk A., Kasche V. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun., **291**, 146-149.
13. Berks B.C., Sargent F., Palmer T. (2000) Mol. Microbiol., **35**, 260-274.
14. Сидорук К.В., Богуш В.Г., Эльдаров М.А., Гончарова О.В., Чугунова Н.М., Покровская М.В., Александрова С.С., Омелянюк Н.М., Соколов Н.Н. (2010) Патент на изобретение РФ № 2441916 от 06.10.2010. Бюлл. изобр. №4, год 10.02.2012.
15. Khatuntseva S.A., Eldarov M.A., Redo V.A., Skryabin K.G. (2008) J. Biotechnol., **133**, 123-126.
16. Volpato G., Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R. (2010) Curr. Med. Chem., **17**(32), 3855-3873.
17. Kurochkina V.B., Sklyarenko A.V. (2008) In: Biotechnology state of the art and prospects for development (Zaikov G.E., ed). Nova Science Publishers, pp. 175-204. https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=6251
18. Курочкина В.Б., Скляренко А.В. (2005) Антибиот. химиотер., **50**(5-6), 39-58.

Поступила: 13. 05. 2015.

RECOMBINANT CEPHALOSPORIN-ACID SYNTHESASE:
OPTIMISATION OF EXPRESSION IN *E. COLI* CELLS, IMMOBILISATION AND
APPLICATION FOR BIOCATALYTIC CEFAZOLIN SYNTHESIS

M.A. Eldarov¹, A.V. Sklyarenko², N.V. Medvedeva², A.A. Jgoun¹, J.E. Satarova², A.I. Sidorenko²,
M.V. Dumina¹, A.S. Emperian³, S.V. Yarotsky²

¹Centre “Bioengineering”, Russian Academy of Sciences,
7/1 60-letya Oktyabrya av., Moscow, 117312 Russia; tel.: 8(499)1356219, e-mail: meldarov@mail.ru

²State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms,
1 1-st Dorozhny proezd, Moscow, 117545 Russia; tel.: 8 (495) 3150465; e-mail: asklyarenko@yandex.ru

³Research and Manufacturing Centre “Armbiotechnology” of Armenian National Academy of Science,
14 Gurdjun str., Nor Norka, 3-d district, Erevan, 0056 Armenia

Cephalosporin acid synthetase (CASA) is responsible for specific to synthesis of cephalosporin-acids, its expression in *Escherichia coli* cells is accompanied by accumulation of unprocessed insoluble precursor. In order to optimize conditions of recombinant CASA production we have studied the effects of several parameters of strain cultivation, including growth media composition, temperature, and inoculation dose. Also plasmids for production of CASA variants with the signal sequence of *Erwinia carotovora* L-asparaginase (ansCASA) and “leaderless” CASA were created in search of more efficient expression constructs. Removal of the N-terminal secretion signal sequence reduced the production of functionally active CASA more than 10-fold and inhibited strain growth. Insertion of the L-asparaginase signal sequence increased the specific enzyme activity in the resultant recombinant strain. The ansCASA producing strain was used to develop the method of immobilization of the recombinant enzyme on an epoxy-activated macroporous acrylic support. The resultant biocatalyst performed effective synthesis of cefazolin from 3-[(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-thiomethyl]-7-aminocephalosporanic acid (MMTD-7-ACA) and methyl ester of 1(H)-tetrazolilacetic acid (METzAA), under mild conditions a transformation level of MMTD-7-ACA to cefazolin of 95% is reached.

Key words: recombinant enzymes, expression optimization, cephalosporin-acids synthetase, antibiotics, cefazolin, biocatalytic synthesis