

Всероссийская конференция «Биомедицинская химия: наука и практика»

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

КОНЬЮГАТЫ L-АСПАРАГИНАЗЫ *RHODOSPIRILLUM RUBRUM* С ПОЛИМЕРАМИ РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРЫ С УЛУЧШЕННЫМИ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Н.В. Добрякова^{1,2*}, Д.Д. Жданов², Е.В. Кудряшова¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991, Москва, ул. Ленинские горы, 1

²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *e-mail: natdobryak@gmail.com

L-аспарагиназа из мезофильной бактерии *Rhodospirillum rubrum* является привлекательным ферментом для потенциального применения при лечении опухолевых заболеваний. Для улучшения каталитических параметров фермента были синтезированы ковалентные конъюгаты с хитозан-ПЭГ, хитозан-гликолем и полиэтиленгликолем. Связывание с полимерами почти не влияло на связывание фермента с субстратом. Наибольшие изменения в содержании вторичных структур были отмечены для конъюгата RrA-ПЭИ. Успех прошедшей модификации оценили методом ИК спектроскопии. Было выявлено, что используемые в работе поликатионы оказывают положительный эффект на каталитическую активность фермента. Конъюгат RrA-хитозан-ПЭГ обладал наибольшей ферментативной активностью.

Ключевые слова: L-аспарагиназа, *Rhodospirillum rubrum*, ковалентные конъюгаты, КД спектрометрия, ИК спектрометрия, полимеры

DOI: 10.18097/BMCRM00229

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в химиотерапии лейкозов используют препараты L-аспарагиназы из *Escherichia coli* (EcA) и её ПЭГилированной формы, а также *Erwinia chrysanthemi* (ErA) [1–3]. Основной механизм действия ферментов связан с их способностью гидролизовать L-аспарагин, что приводит к снижению его концентрации в кровотоке. Опухолевые клетки более чувствительны к недостатку L-аспарагина, чем здоровые клетки, и при снижении концентрации данной аминокислоты опухолевая клетка гибнет. Основной проблемой использования L-аспарагиназ в химиотерапии является гиперчувствительность, которая развивается у пациентов, получающих EcA или ErA.

В связи с упомянутыми проблемами актуален поиск новых источников L-аспарагиназ с более подходящими свойствами. Один из перспективных ферментов — L-аспарагиназа из бактерии *Rhodospirillum rubrum* (RrA). Данный фермент имеет низкую гомологию с EcA и ErA и более короткую аминокислотную последовательность (172 аминокислотных остатка, 18 кДа), что делает его потенциально менее иммуногенным. RrA имеет выраженную противоопухолевую активность на ряде клеточных линий лейкозных клеток *in vitro*, а также *in vivo* [4]. Важным преимуществом является также то, что она обладает меньшей L-глутаминазной активностью, которая составляет менее 0.1% от L-аспарагиназной активности. Недостатком RrA

являются сдвинутый в щелочную область pH оптимум и высокая константа Михаэлиса (K_M). Из-за этого активность L-аспарагиназы в физиологических условиях может снижаться.

Для оптимизации функциональных свойств RrA в настоящей работе предложено исследовать влияние полиэлектролитов природного и синтетического происхождения, а именно хитозана и полиэтиленглимина, на каталитические характеристики.

МЕТОДИКА

Синтез конъюгатов L-аспарагиназы с сополимерами на основе хитозана

Синтез конъюгатов L-аспарагиназы с сополимерами хитозан-гликоль, хитозан-ПЭГ осуществляли по реакции восстановительного аминирования с аминогруппами фермента [5]. Соплимер хитозана с активированным ПЭГ был синтезирован по методике, разработанной ранее в нашей лаборатории [6, 7]. Для осуществления реакции к 4 мг/мл раствора RrA в 10 mM буфере PBS pH 7.5 (“Эко-Сервис”, Россия) добавляли растворы вышеперечисленных полимеров в мольном отношении фермент:полимер от 1:3 до 1:5. Полученные смеси инкубировали при постоянном перемешивании в течение 40 мин при 16°C. Затем к растворам добавляли пятикратный избыток цианборгидрида натрия и инкубировали ещё 40 мин при той же температуре. Чтобы очистить полученные продукты от непрореагировавшего сополимера



использовали диафильтрацию на фильтрах Amicon (“Merck-Millipore”, США) с пропускной способностью частиц менее 50 кДа.

Синтез конъюгатов L-аспарагиназы с полиэтиленгликолем

Для синтеза брали линейный полиэтиленгликоль 2 кДа (ПЭИ, “Sigma-Aldrich”, США). В ходе реакции происходило образование амидных связей между аминогруппами полиаминов и карбоксильных групп фермента в присутствии реактива Вудварда К (“Sigma-Aldrich”). Препарат RrA растворяли в 100 мМ фосфатном буфере pH 6.0 до конечной концентрации фермента 5 мг/мл. Полиамин также растворяли в фосфатном буфере до мольных соотношений фермент:полиамин = 1:10. При необходимости pH растворов полиаминов доводили до pH 6. Затем к ферменту в фосфатном буфере добавляли раствор полиамина (ПЭИ). К конечной смеси с концентрацией фермента 1 мг/мл добавляли 10 мкл 5 мг/мл раствора реактива Вудварда. Итоговую смесь инкубировали при комнатной температуре при перемешивании в течение 2–3 ч. Полученные растворы конъюгатов очищали на фильтрах Amicon (“Merck-Millipore”) с пропускной способностью частиц 3–50 кДа с заменой фосфатного буфера на 10 мМ PBS pH 7.5. Полученные конъюгаты лиофилизировали и хранили при -20°C.

Регистрация спектров кругового дихроизма

КД спектры растворов L-аспарагиназы, а также очищенные растворы конъюгатов регистрировали с помощью КД-спектрометра J-815 (“Jasco”, Япония), оснащённого термостатируемой ячейкой. Измерения проводили в диапазоне длин волн 200–260 нм при температуре 37°C в кварцевой кювете с длиной оптического пути $l = 1$ мм. Спектры получали 3-кратным сканированием с шагом 1 нм. В кювету добавляли 300 мкл образцов фермента и конъюгатов в 10 мМ PBS pH 7.5. Конечная концентрация белка в системе составляла 0.5–1 мг/мл.

Регистрация и анализ инфракрасных спектров

ИК спектры L-аспарагиназы и её конъюгатов получали методом ИК-спектроскопии на ИК-спектрометре Фурье Tensor 27 (“Bruker” Германия), оснащённом МСТ-детектором, охлаждаемым жидким азотом, а также с использованием ИК-Фурье микроскопа MICRAN-3 (“Симекс”, Россия). Измерения проводили в термостатируемой ячейке нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) BioATR-II, с ZnSe-кристаллом (“Bruker”). В типичном эксперименте в ячейку НПВО ИК спектрометра помещали 35 мкл раствора образца в 0.01 М натрий-фосфатном буфере с концентрацией 0.5–1.5 мг/мл.

Спектры измеряли при 22°C в интервале частот 4000–950 cm^{-1} со спектральным разрешением 2 cm^{-1} . Для каждого спектра производили 100-кратное сканирование и усреднение. Регистрацию фона проводили в аналогичных условиях. Результирующие спектры по необходимости спрямляли методом Савицкого-Голла до спектрального разрешения 4 cm^{-1} . Анализ спектров проводили с помощью программы Opus 7.0.

Определение дзета-потенциалов препаратов L-аспарагиназы

Определение дзета-потенциалов препаратов L-аспарагиназы проводили с помощью прибора Zetasizer Nano ZS (“Malvern Panalytical”, Великобритания) в очищенных водных растворах Milli-Q, содержащих 1 мг/мл белка. Измерения проводили в полипропиленовой кювете при комнатной температуре. Для получения каждого значения дзета-потенциала выполняли от 10 до 15 сканирований и усредняли данные.

Определение каталитических параметров препаратов L-аспарагиназы

Каталитическую активность нативной L-аспарагиназы, её ковалентных конъюгатов измеряли с помощью КД-спектрометра Jasco J-815 по методике, разработанной ранее [7]. В эксперименте смешивали растворы L-аспарагина и фермента в 10 мМ PBS до конечных концентраций 20 мМ и 0.03–0.035 мг/мл соответственно. Регистрировали изменение эллиптичности на длине волны 210 нм во времени. Реакцию проводили в кварцевой кювете объёмом 300 мкл с длиной оптического пути $l = 1$ мм в термостатируемой ячейке при 37°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оптимизации каталитических параметров RrA в работе было изучено влияние на фермент полиэлектролитов различной природы (табл. 1).

Влияние модификации на структуру фермента и состав полученных конъюгатов после очистки оценивали с помощью ИК и КД спектроскопии. На рисунке 1 показаны ИК спектры очищенных растворов конъюгатов RrA-хитозан-ПЭГ, RrA-хитозан-гликоль, RrA-ПЭИ. На спектрах как нативного фермента, так и ковалентных конъюгатов чётко видны характеристические пики амида I (вал. C=O) на 1600–1700 cm^{-1} и амида II (деф. N-H) на 1500–1600 cm^{-1} , соответствующие поглощению амидных связей в белках. У первых двух конъюгатов с хитозан-ПЭГ и хитозан-гликолем и у свободных полимеров был отмечен пик в районе 1000–1150 cm^{-1} , соответствующий колебаниям C-O-C связей в пиранозном цикле хитозана [8].

Таблица 1. Характеристика полимеров, используемых в работе

| Полимер | ММ, кДа | Происхождение | Структура | Заряд |
|-------------------|----------------------|-------------------|-----------|-------|
| Хитозан-ПЭГ | 7 + 5 (30 цепей ПЭГ) | Природный | Линейный | + |
| Хитозан-гликоль | 72 | Полусинтетический | Линейный | + |
| Полиэтиленгликоль | 2 | Синтетический | Линейный | + |

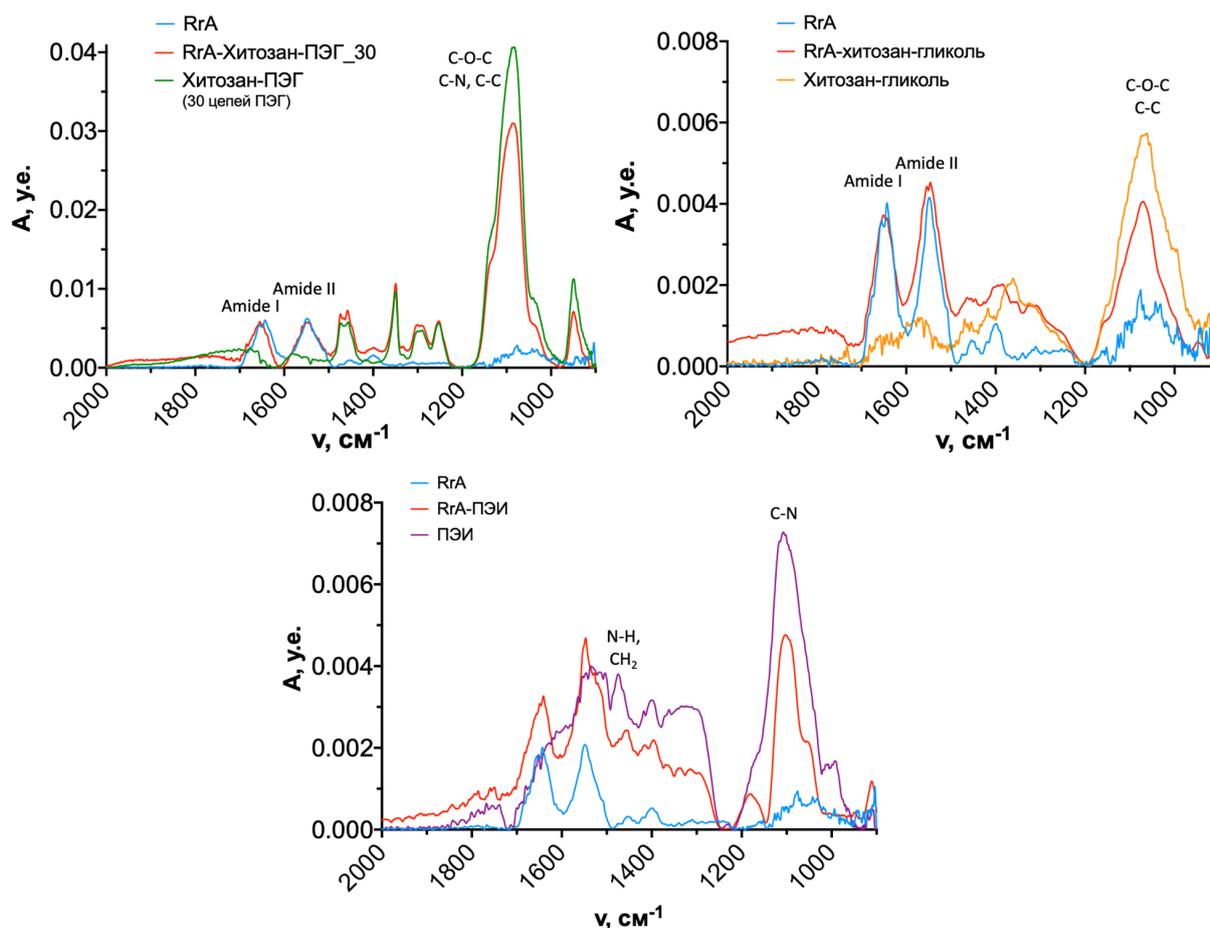


Рисунок 1. ИК спектры нативного фермента в сравнении с конъюгатами. На рисунке слева направо, сверху вниз: RrA-хитозан-ПЭГ, RrA-хитозан-гликоль, RrA-ПЭИ. Концентрация RrA – 1 мг/мл, хитозан-ПЭГ – 1.5 мг/мл, хитозан-гликоль – 0.8 мг/мл, ПЭИ – 0.1 мг/мл. PBS 10 mM, 22°C.

У конъюгатов с полиэтиленимином имеются полосы поглощения на 1460 см^{-1} (колебания N-H вторичных аминогрупп и CH_2 связей). У RrA-ПЭИ имеется интенсивная широкая полоса при $1050\text{--}1150\text{ см}^{-1}$, соответствующая колебаниям C-N связей в молекуле полиамина (вал. C-N). Кроме того, некоторый вклад в интенсивность пика амид I может вносить полоса на 1620 см^{-1} , соответствующая колебаниям N-H связей аминов. Также можно выделить и в полимере, и в конъюгате полосу при $1450\text{--}1640\text{ см}^{-1}$ (N-H, CH_2). Исходя из полученных ИК спектров можно предположить, что модификация RrA с использованием двух методов модификации для всех образцов прошла успешно.

С помощью КД спектрометрии полученные конъюгаты были проанализированы на содержание вторичных структур в сравнении с нативным ферментом. На рисунке 2 представлены КД спектры нативного фермента и конъюгатов. Из рисунка 2 видно, что форма спектра, характерная для нативного фермента, сохраняется и для всех конъюгатов. Содержание вторичных структур практически не меняется. Можно заметить, что у конъюгатов немного снижается содержание α -спиралей и увеличивается процент неупорядоченных структур (табл. 2). Увеличивается также процент антипараллельных β -структур, которые отвечают

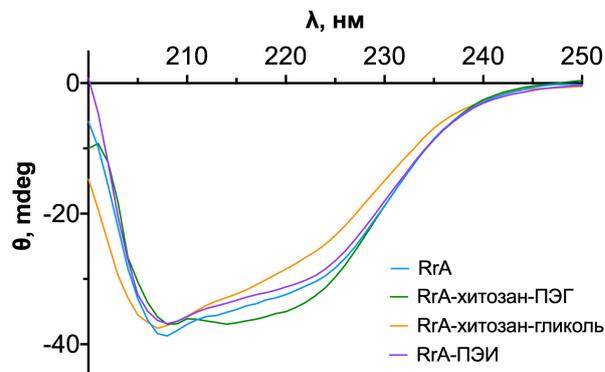


Рисунок 2. КД спектры нативного фермента и конъюгатов, $C(\text{RrA}) = 1\text{ мг/мл}$, 0.01 М PBS , 3°C , $\text{pH } 7.5$.

за агрегацию [9]. Наиболее сильные изменения были отмечены для RrA-ПЭИ: количество α -спиралей снижалось на 6% в сравнении с нативным ферментом.

Чтобы охарактеризовать полученные конъюгаты и найти корреляции между поверхностным зарядом и активностью фермента измерили заряд поверхности частиц и каталитические параметры (табл. 3). Удельная активность у всех конъюгатов была выше, по сравнению с нативным ферментом. Сродство к субстрату (K_M) оставалось практически неизменным для всех конъюгатов. Для RrA-ПЭИ

Таблица 2. Процентное содержание элементов вторичной структуры нативного фермента и конъюгатов, посчитанные в программе CDNN

| Состав конъюгатов | Альфа-спираль | Параллельные бета-листы | Антипараллельные бета-листы | Бета-повороты | Неупорядоченная структура |
|-------------------|---------------|-------------------------|-----------------------------|---------------|---------------------------|
| RgA | 37±2 | 8±1 | 7±1 | 16±1 | 31±2 |
| RgA-хит-ПЭГ | 32±2 | 9±1 | 9±1 | 17±1 | 33±2 |
| RgA-хит-гликоль | 34±2 | 8±1 | 9±1 | 17±1 | 33±2 |
| RgA-ПЭИ | 31±1 | 9±1 | 9±1 | 17±1 | 34±1 |

Таблица 3. Каталитические параметры и значения дзета-потенциала нативной RgA и её конъюгатов. Активность гидролиза 20 mM L-Asn измерена в 10 mM PBS pH 7.5 при 37°C

| Образец | K_M , мМ | V_m , МЕ/мг | Дзета-потенциал, мВ |
|---------------------|------------|---------------|---------------------|
| RgA | 5.3±1.1 | 46±2 | -11.0±1.3 |
| RgA-хитозан-ПЭГ | 5.1±1.0 | 64±5 | -5.7±1.4 |
| RgA-Хитозан-гликоль | 4.1±1.0 | 52±3 | +0.2±0.6 |
| RgA-ПЭИ | 3.5±0.9 | 49±2 | -4.0±1.8 |

K_M снижалась в 1.5 раза, что может быть связано с небольшим размером поликатиона (2 кДа), который не препятствует связыванию субстрата. Наибольшая удельная активность наблюдалась для конъюгата RgA-хитозан-ПЭГ (прирост на 35% в сравнении с нативной RgA), имеющего значения дзета-потенциала -5.7. Наименьший прирост активности обнаружен для RgA-хитозан-гликоль (на 13%) и RgA-ПЭИ (на 6%). В целом, для всех конъюгатов было выявлено увеличение величины дзета-потенциалов за счёт аминокислотных групп в хитозане или ПЭИ. При этом в ПЭГ-хитозане часть аминокислотных групп прореагировала с ПЭГ и не вносила вклад в положительный заряд. Также цепи ПЭГ могут экранировать часть свободных аминокислотных групп. Это может способствовать тому, что молекула L-аспарагина свободно диффундирует к активному центру фермента. Также положительный заряд может влиять на локальный pH вблизи активного центра, сдвигая его pH оптимум в сторону более кислых значений и увеличивая тем самым активность фермента [5]. Положительный заряд аминокислотных групп может способствовать более длительному удержанию продукта в микроокружении фермента и снижать скорость катализа. Так, вероятно, могло происходить с RgA-ПЭИ. Кроме того, исходя из результатов КД спектроскопии, ПЭИ может дестабилизировать структуру фермента и влиять тем самым на его активность.

В данном случае стоит учитывать не только заряд частиц, но также и структуру поликатионов. Вероятно, ПЭГ за счёт экранирования сильно положительных зарядов аминов оказывает более мягкое воздействие на фермент и способствует большему увеличению его активности. В ранней нашей работе с EwA и её конъюгатами с хитозан-ПЭГ разной молекулярной массы было также показано, что с помощью ПЭГ можно регулировать физико-химические свойства фермента [10]. ПЭГилирование хитозана увеличивало активность в 3–4 раза. Хотя в случае RgA мы не наблюдаем такого сильного изменения активности, тем не менее полученные результаты позволяют подтвердить эффективность применения ПЭГилированных поликатионов. Кроме того, данная модификация практически не нарушала

структуру фермента и не снижала его активность, что наблюдалось, например в случае ПЭГилирования L-аспарагина [11, 12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было оценено влияние поликатионов различной природы на L-аспарагиназу *R. rubrum*, которая может стать новым альтернативным противоопухолевым препаратом. Методами ИК и КД спектроскопии подтвердили прошедшую модификацию RgA, а также оценили влияние поликатионов на вторичную структуру фермента. Все конъюгаты отличались от нативного фермента повышенной активностью и неизменным сродством к L-аспарагину. Данные результаты показывают перспективность применения поликатионов различной природы для модификации RgA и улучшения её биокаталитических свойств.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова (ИК-Фурье спектрометр Tensor 27, ИК-Фурье микроскоп MICRAN-3, спектрометр кругового дихроизма Jasco J-815).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800499-5).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Sokolov, N.N., Eldarov, M.A., Pokrovskaya, M.V., Aleksandrova, S.S., Abakumova, O.Y., Podobed, O.V., Melik-Nubarov, N.S., Kudryashova, E.V., Grishin, D.V., Archakov, A.I. (2015) Bacterial recombinant L-asparaginases: Properties, structure and anti-proliferative activity. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **61**(3), 312–324. DOI: 10.18097/PBMC20156103312
- Piątkowski-Jakubas, B., Krawczyk-Kuliś, M., Giebel, S., Adamczyk-Cioch, M., Czyż, A., Lech-Marañda, E., Paluszewska, M., Pałynyczko, G., Piszcz, J., Hołowiecki, J. (2008) Use of L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia: Recommendations of the Polish adult leukemia group. *Polish Archives Internal Medicine*, **118**(11), 664–669. DOI: 10.20452/pamw.518
- Fernandez, C.A., Stewart, E., Panetta, J.C., Wilkinson, M.R., Morrison, A.R., Finkelman, F.D., Sandlund, J.T., Pui, C.H., Jeha, S., Relling, M.V., Campbell, P.K. (2014) Successful challenges using native *E. coli* asparaginase after hypersensitivity reactions to PEGylated *E. coli* asparaginase. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **73**(6), 1307–1313. DOI: 10.1007/s00280-014-2464-2
- Pokrovskaya, M.V., Pokrovskiy, V.S., Aleksandrova, S.S., Anisimova, N.Yu., Andrianov, R.M., Treschalina, E.M., Ponomarev, G.V., Sokolov, N.N. (2012) Recombinant intracellular *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase with low L-glutaminase activity and antiproliferative effect. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **59**(2), 192–208. DOI: 10.18097/PBMC20135902192
- Malakhova, M.A., Pokrovskaya, M.V., Alexandrova, S.S., Sokolov, N.N., Kudryashova, E.V. (2018) Regulation of catalytic activity of recombinant L-asparaginase from *Rhodospirillum rubrum* by conjugation with a PEG-chitosan copolymer. *Moscow University Chemistry Bulletin*, **73**, 185–191. DOI: 10.3103/S0027131418040065
- Deygen, I.M., Kudryashova, E.V. (2014) Structure and stability of anionic liposomes complexes with PEG-chitosan branched copolymer. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **40**, 547–557. DOI: 10.1134/S1068162014050057
- Sukhoverkov, K.V., Kudryashova, E.V. (2015) PEG-chitosan and glycol-chitosan for improvement of biopharmaceutical properties of recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 113–119. DOI: 10.1134/S0006297915010137
- Deygen, I.M., Kudryashova, E.V. (2016) New versatile approach for analysis of PEG content in conjugates and complexes with biomacromolecules based on FTIR spectroscopy. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **141**, 36–43. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.01.030
- Kudryashova, E.V., Visser, A.J.W.G., Jongh, H.H.J.D.E. (2005) Reversible self-association of ovalbumin at air-water interfaces and the consequences for the exerted surface pressure. *Protein Sci.*, **14**, 483–493. DOI: 10.1110/ps.04771605
- Kudryashova, E.V., Sukhoverkov, K.V., Sokolov, N.N. (2015) PEG-chitosan branched copolymers to improve the biocatalytic properties of *Erwinia carotovora* recombinant L-asparaginase. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **61**(4), 480–487. DOI: 10.18097/PBMC20156104480
- Kuchumova, A.V., Krasotkina, Y.V., Khasigov, P.Z., Sokolov, N.N. (2007) Modification of recombinant asparaginase from *Erwinia carotovora* with polyethylene glycol 5000. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **53**(1), 107–111.
- Ramirez-Paz, J., Saxena, M., Delinois, L.J., Joaquin-Ovalle, F.M., Lin, S., Chen, Z., Rojas-Nieves, V.A., Griebenow, K. (2018) Thiol-maleimide poly(ethylene glycol) crosslinking of L-asparaginase subunits at recombinant cysteine residues introduced by mutagenesis. *PLoS ONE*, **13**(7), e0197643. DOI: 10.1371/journal.pone.0197643

Поступила: 24. 06. 2024.
 После доработки 25. 07. 2024.
 Принята к публикации: 01. 08. 2024.

L-ASPARAGINASE CONJUGATES OF *RHODOSPIRILLUM RUBRUM* WITH POLYMERS OF DIFFERENT STRUCTURES WITH IMPROVED BIOCATALYTIC PROPERTIES

N.V. Dobryakova^{1,2*}, D.D. Zhdanov², E.V. Kudryashova¹

¹Moscow State University,
 1 Leninskie Gory str., Moscow, 119991 Russia

²Institute of Biomedical Chemistry,
 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: natdobryak@gmail.com

L-asparaginase from the mesophyllic bacterium *Rhodospirillum rubrum* shows promise as a potential biomedicine treatment for tumor diseases. To enhance the enzyme's catalytic parameters, we have synthesized covalent conjugates with chitosan-PEG, chitosan-glycol and polyethylenimine. Interestingly, binding to these polymers had minimal impact on the enzyme's substrate binding constant. The RrA-PEI conjugate showed the most significant changes in secondary structure content. The success of the previous modification was evaluated by IR spectroscopy, which indicated that the polycations used in the work have a positive effect on the catalytic activity of the enzyme. The RrA-chitosan-PEG conjugate demonstrated the highest enzymatic activity.

Key words: L-asparaginase; *Rhodospirillum rubrum*; covalent conjugates; CD spectrometry; IR spectrometry; polymers

FUNDING

The work was done in the framework of the Russian Federation fundamental research program for the long-term period (2021–2030) (No. 122022800499-5). The work was performed using equipment (Bruker Tensor 27 FT-IR spectrometer (Germany), MICRAN-3 FTIR microscope (Simex, Russia), and Jasco J-815 circular dichroism spectrometer (Jasco, Japan)) of the Lomonosov Moscow State University Development Program.

Received: 24.06.2024; revised: 25.07.2024; accepted: 01.08.2024.