

## СТАБИЛИЗАЦИЯ L-АСПАРГИНАЗ *Erwinia carotovora* И *Rhodospirillum rubrum* В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСОВ С ПОЛИКАТИОНАМИ

© 2022 г. Н. В. Добрякова<sup>1</sup>, Е. В. Кудряшова<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: helenakoudriachova@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.07.2022 г.

После доработки 13.07.2022 г.

Принята к публикации 09.08.2022 г.

Исследовано влияние сополимеров хитозана и полиэтиленimina (ПЭИ) на удельную активность L-аспарагиназ *Erwinia carotovora* (EwA) и *Rhodospirillum rubrum* (RrA) при разных pH, а также влияние поликатионов на механизм термоинактивации и трипсинолиза ферментов. С помощью спектроскопии кругового дихроизма определена каталитическая активность полиэлектролитных комплексов (ПЭК), а также изменение структуры нативных ферментов до и после инкубации при повышенных температурах. Для большинства ПЭК pH-оптимум сдвигается на 0.5 единиц в сторону более кислых значений за счет поликатионной природы полиэлектролитов. Выявлено, что инактивация EwA протекает преимущественно за счет агрегации, а RrA подвергается денатурации без агрегации. Обнаружены стабилизирующие эффекты при комплексобразовании: хитозан сильнее стабилизировал EwA, чем RrA при термоинактивации. Образование ПЭК с хитозаном и его сополимерами замедляли агрегацию EwA. ПЭК RrA с ПЭИ оказался наиболее оптимальным для этой L-аспарагиназы: константа термоинактивации первого порядка снижалась в 2.2 раза по сравнению с нативным ферментом, а константа инактивации при трипсинолизе – в 2 раза. Применение хитозан-ПЭГ позволило увеличить или сохранить высокий уровень каталитической активности обоих ферментов, при этом повысив и их термостабильность.

**Ключевые слова:** L-аспарагиназа, *Erwinia carotovora*, *Rhodospirillum rubrum*, полиэлектролитные комплексы, термостабильность

**DOI:** 10.56304/S0234275822050040

Бактериальные L-аспарагиназы катализируют гидролиз L-аспарагина до L-аспарагиновой кислоты и аммиака. Эти ферменты применяют для лечения некоторых типов лейкозов, в частности острого лимфобластного лейкоза [1]. Одна из проблем, с которыми сталкиваются при лечении этого заболевания, – возникновение гиперчувствительности к L-аспарагиназам, вследствие чего эффективность лечения снижается. В связи с этим важно изучать L-аспарагиназы из разных источников – чтобы иметь альтернативный вариант для лечения при возникновении аллергии. К применяемым на практике препаратам на данный момент относится L-аспарагиназа из *Escherichia coli* (EcA), а также ее ПЭГилированный аналог [2]. При развитии гиперчувствительности к EcA применяют L-аспа-

рагиназу из другого источника – *Erwinia chrysanthemi* (ErA) [3, 4]. Ближайший аналог ErA – рекомбинантный фермент *Erwinia carotovora* (EwA), экспрессированный в клетках *E. coli* [5, 6]. Другим перспективным ферментом для лечения может стать короткоцепочечная L-аспарагиназа *Rhodospirillum rubrum* (RrA), которая обладает высокой противоопухолевой активностью и сниженной иммуногенностью по сравнению с упомянутыми выше ферментами. Однако эти ферменты имеют смещенный в щелочную область pH-оптимум, низкую стабильность и могут вызывать иммунный ответ организма при длительном лечении. С учетом этих факторов для создания препарата с улучшенными свойствами применяют различные методы модификации ферментов с помощью полимеров. Так, раньше в нашей лаборатории были получены ковалентные конъюгаты EwA с сополимерами хитозана с улучшенными каталитическими свойствами, более высокой стабильностью и бо-

Список сокращений: КД – круговой дихроизм; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ПЭИ – полиэтиленimin; ПЭК – полиэлектролитный комплекс; EwA – L-аспарагиназа *Erwinia carotovora*; RrA – L-аспарагиназа *Rhodospirillum rubrum*.

лее эффективными противоопухолевыми характеристиками, чем у нативного фермента [7–9].

Для дальнейшей оптимизации подхода получения высокоэффективных и стабилизированных ферментных препаратов мы решили изучить полиэлектролитные комплексы (ПЭК) EwA и RrA. Такие комплексы легко получать в растворе за счет ион-ионных взаимодействий между заряженными группами полиэлектролита и белка. Известно, что формирование ПЭК позволяет варьировать свойства ферментов, такие как каталитическая активность, термостабильность, снижать иммуногенность, а также изменять их pH-оптимум.

Ранее нами выявлено, что поликатионы (хитозан с  $M_r$  5–15 кДа и его сополимеры) в составе ковалентных конъюгатов положительно влияют на физико-химические свойства EwA и RrA. В частности, конъюгат с хитозан-ПЭГ увеличивает активность ферментов и их термостабильность, а также позволяет сдвинуть pH-оптимум в более кислую область [9]. Также было обнаружено, что в буфере с 0.05 М Tris активность RrA увеличивалась примерно в 1.5 раза, из чего был сделан вывод о необходимости компенсировать отрицательный поверхностный заряд фермента RrA ( $pI = 5.1$ ) для усиления его каталитических свойств.

В связи с этим целью работы стало изучение каталитических свойств и термостабильности ПЭК L-аспарагиназ с производными хитозана и полиэтиленimina (ПЭИ).

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Реагенты

В работе использовали следующие реагенты: L-аспарагин (BioChemica, Великобритания); фосфатно-солевой буфер (PBS; “Эко-Сервис”, Россия); NaOH, цитрат натрия, борная кислота, DMSO (Sigma-Aldrich, США); хитозан-HCl 7 кДа (Центр “Биоинженерия” РАН, Россия); хитозан-гликоль 72 кДа, монометокси-ПЭГ-*N*-гидроксисукцинимидилсукцинат 5 кДа (mPEG-suc-NHS) (Sigma-Aldrich); линейный полиэтиленимин 30–40 кДа (Serva, Германия).

### Получение ферментных препаратов L-аспарагиназ

Препарат рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* получали с использованием рекомбинантного штамма *E. coli* BL21(DE3)/pRACYC177\_LANS, сконструированного ранее и описанного в работе [5]. Ген RrA был выделен из *Rhodospirillum rubrum* (коллекция кафедры микробиологии МГУ им. М.В. Ломоносова) с использованием вектора pET23a (Novagen, США). В 200 мл LB-среды, содержащей 100 мкг/мл ампицилина, вносили 3 мл ночной культуры и растили при 37°C при перемешивании со скоростью

150–180 об/мин до оптической плотности 1.5–2.0 при длине волны 600 нм ( $OD_{600}$ ), после чего в среду добавляли индуктор синтеза L-аспарагиназы изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0.1 мМ. Клетки инкубировали в течение 16–20 ч в вышеуказанных условиях, осаждали центрифугированием (15 мин, 5000 g) и хранили при –20°C. EwA выделяли путем разрушения клеток на френч-прессе с последующим высаливанием целевого продукта сернокислым аммонием и хроматографической очисткой на колонке с SP-сефарозой [5]. Экстракт клеток, содержащих RrA, очищали на колонке с Q-сефарозой [10].

### Синтез сополимера хитозан-ПЭГ

Сополимер хитозана с активированным ПЭГ синтезировали по описанной ранее методике [9, 11]. Хитозан с  $M_r$  7 кДа растворяли в 3%-ной уксусной кислоте до конечной концентрации 5 мг/мл, pH раствора доводили до 6.5 с помощью 10 мМ PBS и добавляли по каплям раствор активированного ПЭГ в DMSO. ПЭГ брали в 2-кратном молярном избытке по отношению к аминогруппам хитозана. В ходе реакции (2–2.5 ч) поддерживали pH в области 7.0–7.5. Полученный продукт диализовали против 10 мМ PBS (pH 7.3) в течение 24 ч. Число цепей ПЭГ, приходящихся на молекулу хитозана, определяли по калибровочной зависимости для ПЭГ методом ИК-спектromетрии [12].

### Получение полиэлектролитных комплексов

ПЭК с L-аспарагиназой получали, смешивая растворы 5 мг/мл L-аспарагиназы и ионогенного полимера до достижения конечного молярного соотношения фермент : полиэлектролит = 1 : 5. Растворы инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего измеряли гидролитическую активность полученных комплексов, используя в качестве субстрата L-аспарагин. Эксперимент проводили в трех повторах.

### Определение удельной активности препаратов L-аспарагиназ

Ферментативную активность L-аспарагиназ и их ПЭК измеряли на спектрометре кругового дихроизма (КД) Jasco J-815 (Jasco, Япония) по методике, описанной ранее [13]. Реакцию проводили, смешивая растворы L-аспарагина и L-аспарагиназы в 10 мМ PBS (pH 7.3) до конечных концентраций 20 мМ и 0.030–0.035 мг/мл соответственно. Изменение эллиптичности регистрировали при длине волны 210 нм. Реакцию проводили в кварцевой кювете объемом 300 мкл с длиной оптического пути 1 мм в термостатируемой ячейке

**Таблица 1.** Характеристика поликатионов, использованных для получения полиэлектролитных комплексов с L-аспарагиназами**Table 1.** Characteristics of polycations used for obtaining polyelectrolyte complexes with L-asparaginases

Поликатион	$M_r$ , кДа	Структура
Хитозан	7	Линейная
Хитозан-гликоль	72	Линейная
Хитозан-ПЭГ (30 цепей ПЭГ)	>100	Разветвленная
ПЭИ	30–40	Линейная

при 37°C. Удельную активность ферментов ( $A$ ) рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\operatorname{tg} \alpha}{\Delta \varepsilon l m(E)} D_f,$$

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\Delta \theta}{\Delta t},$$

где  $\operatorname{tg} \alpha$  – изменение эллиптичности  $\Delta \theta$  за промежуток времени  $\Delta t$  (наклон начального участка кинетической кривой);  $\Delta \varepsilon$  – разница молярных коэффициентов поглощения L-аспарагина и L-аспарагиновой кислоты;  $l$  – длина оптического пути (толщина кюветы);  $m(E)$  – масса фермента,  $D_f$  – коэффициент (кратность разведения) раствора фермента.

#### *Определение pH-оптимума ферментативной активности препаратов L-аспарагиназ*

Для построения pH-зависимости нативного фермента и ПЭК готовили серию растворов 20 мМ L-аспарагина в 5 мМ цитрат-фосфат-боратном буфере (5 мМ цитрат натрия, 5 мМ гидрофосфат натрия, 5 мМ борная кислота, pH 4.5). Раствором NaOH доводили pH раствора L-аспарагина до требуемых значений – в диапазоне pH 5.5–11.0. К 300 мкл раствора субстрата в кювете добавляли 10 мкл фермента с концентрацией 1 мг/мл и регистрировали активность с помощью КД-спектрометра по методике, описанной выше.

#### *Анализ кинетики инактивации L-аспарагиназ при термической обработке*

Методом КД-спектроскопии исследовали термостабильность препаратов EwA и RrA. В типичном эксперименте раствор образца фермента (1 мг/мл) в 10 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7.5), содержащем 100 мМ NaCl, инкубировали при 45°C для ПЭК с EwA и при 53°C – с RrA. Через каждые 2.5–10 мин инкубации отбирали алиquotы и охлаждали в течение 4–5 мин до комнатной температуры. Ферментативную активность образцов измеряли при 37°C. Полученные данные линеаризовали в координатах реакции первого и второго порядка по уравнениям:

$$\ln \left( \frac{A}{A_0} \right) = -k_{\text{ин}} t,$$

$$\frac{1}{A} = -k_{\text{ин(отн.)}} t,$$

где  $A$  – активность фермента в заданный промежуток времени,  $A_0$  – активность при  $t = 0$  мин,  $k_{\text{ин}}$  – константа инактивации в реакции первого порядка,  $k_{\text{ин(отн.)}}$  – константа инактивации в реакции второго порядка. Величину  $k_{\text{ин}}$  определяли по тангенсу угла наклона начального участка прямой линейных зависимостей.

#### *Определение устойчивости L-аспарагиназ к трипсинолизу*

Стабильность препаратов L-аспарагиназ и их модифицированных форм при трипсинолизе исследовали методом КД-спектроскопии. К раствору нативного фермента или ПЭК, содержащему 2.5–3.0 мг/мл белка в PBS (pH 7.5), добавляли раствор трипсина до конечной концентрации 0.0025 мг/мл. Конечная концентрация L-аспарагиназы в растворе – 1 мг/мл. Смесь перемешивали и инкубировали в термостате при 37°C. Алиquotы отбирали через 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0, 20.0, 30.0, 40.0 и 50.0 мин после начала инкубации. Ферментативную активность образцов незамедлительно определяли методом КД-спектроскопии при 37°C в реакционных смесях, содержащих 0.05 мг/мл ферментного препарата и 20 мМ L-аспарагина в PBS (pH 7.5).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Полиэлектролитные комплексы L-аспарагиназ*

Для определения влияния различных полиэлектролитов на L-аспарагиназы из разных источников в работе были получены ПЭК ферментов EwA и RrA с полимерами различной природы, перечисленными в табл. 1.

Приведенные полимеры – это поликатионы, которые отличаются друг от друга молекулярной массой и структурой, а также величиной заряда в растворе при pH 7.5. Изучаемые L-аспарагиназы имеют различную длину аминокислотной цепи и

**Таблица 2.** Удельная активность EwA и RrA и их комплексов  
**Table 2.** Specific activities for EwA and RrA and PECs obtained

ПЭК	A, ME/мг <sup>a</sup>	
	EwA	RrA
Нативный фермент	490 ± 20	46 ± 3
Хитозан	230 ± 20	41 ± 2
Хитозан-гликоль	262 ± 20	47 ± 2
Хитозан-ПЭГ	466 ± 25	48 ± 2
ПЭИ	400 ± 40	54 ± 3

*Примечание:* <sup>a</sup> Гидролиз проводили при 37°C с использованием в качестве субстрата 20 mM L-аспарагина в 100 mM PBS. Удельную активность измеряли, как описано в разделе “Условия эксперимента”.

*Note:* <sup>a</sup> Hydrolysis was performed at 37°C using 20 mM L-asparagine as substrate in 100 mM PBS. Specific activity was measured as described in “Experimental conditions”.

разный поверхностный заряд. Так, молекулярная масса одной субъединицы EwA равна примерно 34 кДа, а RrA – 18 кДа. Изоэлектрические точки EwA и RrA также различны: 5.1 и 7.6 соответственно. Логично предположить, что столь большие различия в размерах и поверхностных зарядах молекул EwA и RrA могут приводить к различиям и в свойствах получаемых ПЭК. Результаты определения удельной активности EwA и RrA и их комплексов методом КД-спектрометрии [13] представлены в табл. 2.

Для ряда ПЭК обнаружены изменения в уровне каталитической активности. Наибольший прирост активности (на 17%) наблюдали для ПЭК RrA-ПЭИ. Остальные полиэлектролиты практически не изменяли уровень активности RrA. Для ПЭК EwA с хитозан-ПЭГ и ПЭИ активность практически не изменялась, а хитозан ( $M_r$  7 кДа) и хитозан-гликоль ( $M_r$  72 кДа) снижали активность EwA почти в два раза.

Таким образом, наибольшее повышение ферментативной активности EwA и RrA наблюдали в их комплексах с хитозан-ПЭГ. По-видимому, при модификации части аминокислотных групп хитозана возрастает подвижность его цепей, что приводит к мягкому воздействию на фермент, не снижающему его гидролитическую активность. Ранее показано [9, 14], что в составе ковалентных конъюгатов EwA и RrA с хитозан-ПЭГ ферментативная активность этих L-аспарагиназ возрастала в 2–4 раза – в зависимости от степени ПЭГилирования хитозана. Немодифицированный хитозан, в отличие от ПЭГилированных производных, оказывал более сильный эффект, снижая активность ферментов. Это может быть связано с более жесткой по сравнению с хитозан-ПЭГ структурой цепи молекул

хитозана, которая дестабилизирует нативную конформацию белка.

#### *Влияние полиэлектролитов на pH-оптимум активности L-аспарагиназ*

Ранее в нашей лаборатории было показано [9, 14], что у ковалентных конъюгатов EwA и RrA с хитозан-ПЭГ pH-оптимум сдвигается на 0.5–1.0 в сторону более кислых значений pH. В связи с этим представляло интерес проверить влияние других сополимеров хитозана и поликатионов на исследуемые L-аспарагиназы.

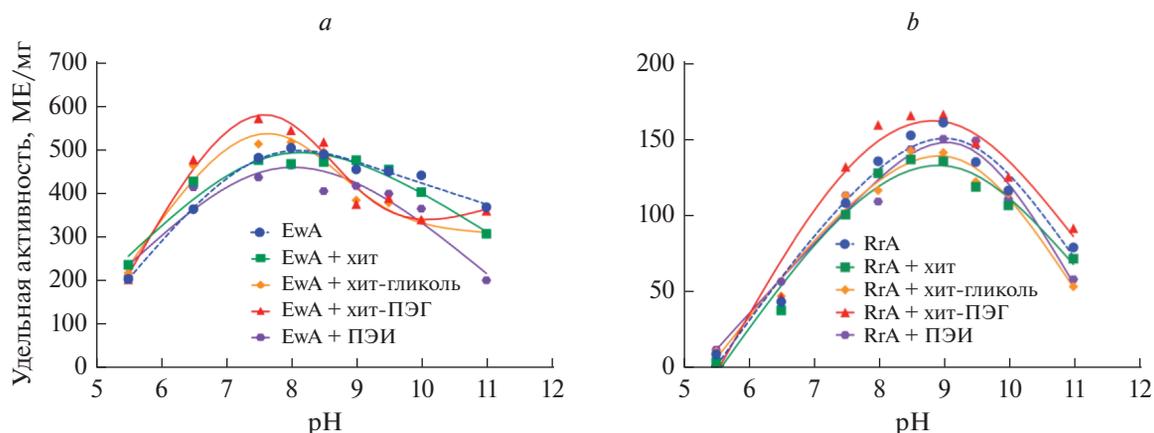
Гидролитическая активность EwA и RrA максимальна в щелочной среде – при pH около 8.0–8.5 и 9.0 соответственно [14, 15]. Поликатионы могут сдвигать pH-оптимум L-аспарагиназ при иммобилизации за счет изменения микроокружения вблизи активного центра. Аминогруппы поликатионов “защелачивают” среду около поверхности фермента, поэтому его pH-оптимум сдвигается в кислую область.

На рис. 1 представлены графики pH-зависимости удельной активности EwA и RrA. У ПЭК обоих ферментов pH-оптимум сдвигается примерно на 0.5 единиц в кислую область. Оптимум активности EwA и RrA в составе ПЭК с хитозан-ПЭГ сдвинулся в область pH 7.5, что показывает эффективность применения данного сополимера для сдвига pH-оптимума ферментов в область физиологических значений pH. Ранее показано [9, 14], что активность EwA и RrA в составе ковалентных конъюгатов с сополимером хитозана в нейтральной среде в 2–4 раза выше, чем нативных ферментов; причем кратность увеличения зависит от степени ПЭГилирования и молекулярной массы хитозана. Для остальных полиэлектролитов (ПЭИ и хитозаны) не выявлено влияния на ферментативную активность EwA и RrA при нейтральных pH. Гидролитическая активность EwA в составе ПЭК повышалась при pH 6.5: на 14% с ПЭИ и на 31% с хитозан-ПЭГ. В других областях pH наблюдали снижение активности EwA относительно нативного фермента, что может быть обусловлено агрегацией белка из-за компенсации зарядов частиц.

Хотя для ПЭК эффект сдвига pH-оптимума менее выражен, чем для ковалентных конъюгатов, иммобилизация ферментов с помощью ПЭК является быстрым и простым способом получения стабилизированных ферментных препаратов.

#### *Термоинактивация L-аспарагиназ и их комплексов*

Чтобы оценить влияние поликатионов на стабильность структуры EwA и RrA, мы изучили термическую устойчивость полученных комплексов при 45°C и 53°C соответственно. При этих температурах ферменты теряют более 80% от



**Рис. 1.** pH-зависимость удельной активности EwA (a) и RrA (b) в нативной форме и в составе ПЭК. Реакцию проводили в 50 мМ цитрат-фосфатном-боратном буфере при 37°C с использованием в качестве субстрата 20 мМ L-аспарагина. Удельную активность рассчитывали, как указано в табл. 2. Условные обозначения: хит – хитозан (здесь и далее).  
**Fig. 1.** pH dependence of the specific activity of EwA (a) and RrA (b) in the native form and in the PEC. The reaction was performed in 50 mM citrate-phosphate-borate buffer at 37°C using 20 mM L-asparagine as substrate. The specific activity was calculated as indicated in Table 2. Notation: chit is chitosan (hereafter).

начальной активности за 1 ч. Оптимум температурной устойчивости L-аспарагиназ достаточно широкий: 25–45°C для EwA и 25–55°C для RrA.

На рис. 2 приведены кривые термоинактивации, полученные при измерении активности ферментов методом КД-спектрометрии, после инкубации L-аспарагиназ при повышенных температурах. Для анализа использовали представление данных в координатах первого и второго порядка. Полученные значения констант инактивации приведены в табл. 3. Для нативной формы EwA обнаружено два временных интервала: на первом инактивация фермента происходит в основном по реакции первого порядка, что соответствует механизму денатурации, а на втором начинают преобладать второй или более высокие порядки, которые означают агрегацию. Все полиэлектролиты, в

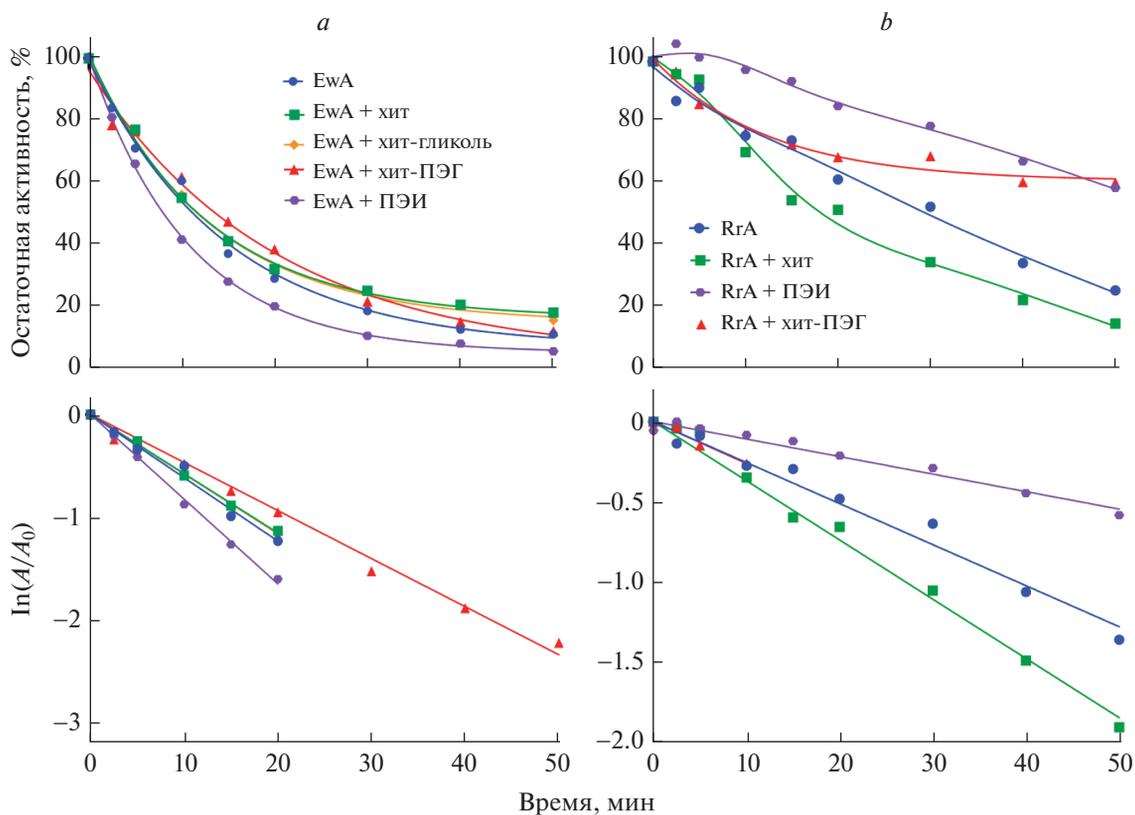
целом, улучшают параметры термостабильности нативного фермента EwA.

Для нативной формы EwA, а также для комплексов с хитозаном и хитозан-гликолем на первом этапе термической обработки, по-видимому, преобладает денатурация молекул фермента, а на втором – их агрегация. Хитозан и хитозан-гликоль препятствуют денатурации и слипанию частиц при повышении температуры. В комплексе с хитозаном остаточная активность EwA выше, чем у нативного фермента: 18 против 11%. В комплексе с хитозан-ПЭГ снижена скорость инактивации EwA и не происходит агрегации молекул фермента. Вероятно, наличие сильно гидратированных цепей ПЭГ предотвращает слипание частиц. Как видно из приведенных данных, в комплексе с ПЭИ термостабильность фермента снижена, что может быть связано с высоким положительным

**Таблица 3.** Константы инактивации и остаточная активность EwA и RrA и их ПЭК после термической обработки  
**Table 3.** Inactivation constants and residual activity of EwA and RrA and their PECs after heat treatment

ПЭК	EwA		RrA	Остаточная активность <sup>a</sup> , %	
	$k_{ин}, \text{мин}^{-1}$	$k_{ин(отн.)}$	$k_{ин}, \text{мин}^{-1}$	EwA	RrA
Нативный фермент	$0.062 \pm 0.003^b$	$0.71 \pm 0.04$	$0.026 \pm 0.002$	11	25
Хитозан	$0.058 \pm 0.003^b$	$0.42 \pm 0.03$	$0.037 \pm 0.003$	18	15
Хитозан-гликоль	$0.059 \pm 0.003^b$	$0.47 \pm 0.04$	н.д. <sup>c</sup>	15	н.д.
Хитозан-ПЭГ	$0.047 \pm 0.002$	–	$0.026 \pm 0.003^d$	12	61
ПЭИ	$0.083 \pm 0.003^b$	–	$0.012 \pm 0.003$	5	59

**Примечание:** <sup>a</sup> Активность измеряли после 50-минутной инкубации препаратов EwA и RrA при 45°C и 53°C соответственно; <sup>b</sup> тангенс угла наклона через 20 мин инкубации; <sup>c</sup> не делали; <sup>d</sup> тангенс угла наклона через 10 мин инкубации.  
**Note:** <sup>a</sup> Activity was measured after 50 min incubation of EwA and RrA preparations at 45°C and 53°C, respectively; <sup>b</sup> tangent angle after 20 min incubation; <sup>c</sup> not done; <sup>d</sup> tangent angle after 10 min incubation.



**Рис. 2.** Кривые термоинактивации (сверху) и полулогарифмические зависимости остаточной активности от времени (снизу) нативных EwA (a) и RrA (b) и их ПЭК после инкубации соответственно при 45 и 53°C в течение 50 мин. Везде концентрация ферментов – 1 мг/мл.  $A$  – удельная активность фермента в момент времени  $t$ ,  $A_0$  – при  $t = 0$ .

**Fig. 2.** Thermal inactivation curves (top) and semi-logarithmic time dependences of residual activity (bottom) of native EwA (a) and RrA (b) and their PECs after incubation at 45 and 53°C, respectively, for 50 min. The concentration of the enzymes was 1 mg/mL.  $A$  and  $A_0$  are the specific activity of the enzyme at time  $t$  and 0, respectively.

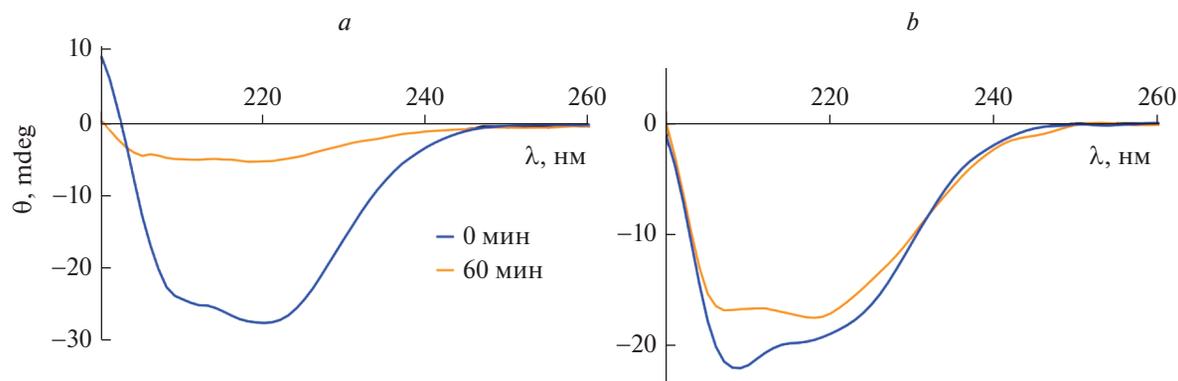
зарядом этого поликатиона, который нарушает конформацию фермента.

В случае RrA полулогарифмические зависимости на всем временном промежутке хорошо описывались прямой, из которой определили константу инактивации ( $k_{ин}$ ) первого порядка. Все полимеры, кроме хитозана, повышали термостабильность RrA. Для RrA в составе ПЭК с хитозан-ПЭГ также, как и в случае с EwA, константа инактивации существенно снижалась, а остаточная активность после 50-минутной инкубации повышалась в 2.4 раза (до 61%) по сравнению с нативным ферментом (рис. 2b). Наиболее выраженный эффект наблюдался для комплекса RrA с ПЭИ: константа инактивации снижалась более чем в 2 раза, а остаточная активность при этом составляла 59%.

В случае RrA не происходит агрегации частиц и основной вклад в механизм термоинактивации вносит денатурация. Из полученных данных видно, что ПЭИ увеличивает стабильность RrA. Кроме того, в первые 5 мин инкубации происходит увеличение активности ПЭК RrA с ПЭИ. Кривая термоинактивации для ПЭК RrA с хитозан-ПЭГ

в полулогарифмических координатах спрямляется только на первых 10 мин. Возможно, на первом этапе фермент переходит в димерную форму, а затем комплекс хитозан-ПЭГ стабилизирует ее и замедляет дальнейшую денатурацию на этом временном интервале. Хитозан не изменял механизм термоинактивации, но ускорял денатурацию RrA фермента, что подтверждает его негативное влияние на конформацию RrA.

На основании полученных кинетических параметров логично предположить, что термическая инактивация EwA и RrA идет по разным механизмам. С целью детализировать их мы использовали метод КД-спектрометрии для анализа изменений конформации EwA и RrA при термической обработке. На рис. 3 представлены КД-спектры EwA и RrA до и после инкубации при повышенной температуре в течение 60 мин. Потеря активности EwA сопровождается практически полным нарушением вторичной структуры: более 80% фермента денатурирует и подвергается агрегации. В оставшихся неп полностью денатурированных молекулах белка наблюдается небольшое увеличение относительно-



**Рис. 3.** Спектры кругового дихроизма EwA (a) и RrA (b) до и после инкубации соответственно при 45°C и 53°C в течение 60 мин.  $\theta$  – эллиптичность.

**Fig. 3.** Circular dichroism spectra of native EwA (a) and RrA (b) before and after incubation for 60 min at 45°C and 53°C, respectively.

го содержания антипараллельных  $\beta$ -структур, отвечающих за формирование агрегатов (табл. 4). Кроме того, в ходе термической обработки в растворе EwA можно наблюдать появление опалесценции, что также косвенно свидетельствует о формировании белковых агрегатов. В случае RrA не выявлено серьезных нарушений конформации при нагревании: всего на несколько процентов снижается число  $\alpha$ -спиралей и возрастает число  $\beta$ -структур, а также содержание неупорядоченных звеньев.

Изоэлектрическая точка (pI) EwA близка к pH 7.5, фермент в буфере с нейтральным pH сильнее подвержен агрегации из-за слипания частиц с нейтральным зарядом. Так как EwA и RrA являются тетрамерами, потеря активности RrA при прогревании может быть связана с обратимой диссоциацией тетрамерной структуры, которая частично восстанавливается при охлаждении и при добавлении субстрата [16].

Таким образом, формирование ПЭК L-аспарагиназ с поликатионами позволяет получить стабилизированные ферментные препараты. Ранее мы сообщали [9], что ковалентное связывание EwA с

хитозан-ПЭК позволяет увеличить термостабильность фермента примерно в 2 раза при 50-минутной инкубации при 45°C. Теперь показано, что образование ПЭК также позволяет повысить стабильность фермента до 2 раз.

#### *Устойчивость препаратов L-аспарагиназ к трипсинолизу*

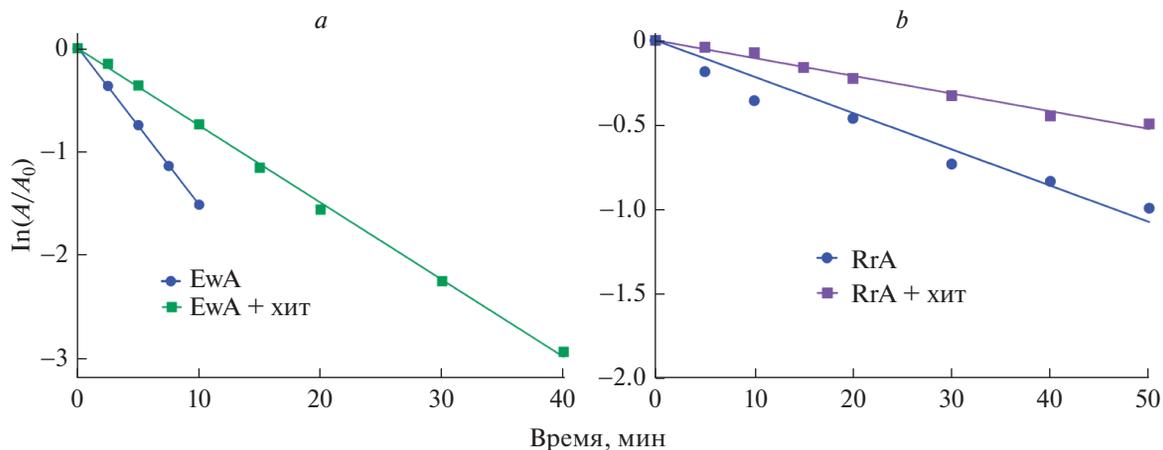
Устойчивость к трипсинолизу считается важным маркером, который коррелирует со временем жизни фермента в кровотоке. Ранее показано, что модификация RrA полимерами на основе хитозана позволяет значительно увеличить стабильность фермента к трипсинолизу [17]. Мы предположили, что ПЭК исследуемых нами ферментов также могут быть более устойчивы к действию трипсина и определили устойчивость к деградации под действием трипсина для наиболее устойчивых ПЭК: EwA + хитозан и RrA + ПЭИ (рис. 4).

Из приведенного графика следует, что устойчивость ПЭК EwA + хит и RrA + ПЭИ к трипсинолизу существенно выше, чем у нативных ферментов. Полученные данные аппроксимируются

**Таблица 4.** Содержание элементов вторичной структуры в молекулах EwA и RrA до и после температурной обработки

**Table 4.** Content of secondary structure elements in EwA and RrA molecules before and after temperature treatment

Элемент вторичной структуры	Содержание, %			
	EwA		RrA	
	0 мин	60 мин	0 мин	60 мин
$\alpha$ -спирали	34.7 $\pm$ 0.6	32.8 $\pm$ 0.9	37.4 $\pm$ 0.9	34.6 $\pm$ 0.7
Антипараллельные $\beta$ -листы	7.8 $\pm$ 0.3	8.4 $\pm$ 0.7	6.7 $\pm$ 0.5	7.8 $\pm$ 0.4
Параллельные $\beta$ -листы	8.5 $\pm$ 0.3	8.9 $\pm$ 0.2	7.0 $\pm$ 0.5	8.5 $\pm$ 0.3
$\beta$ -повороты	16.5 $\pm$ 0.2	16.9 $\pm$ 0.3	15.8 $\pm$ 0.3	16.6 $\pm$ 0.2
Неупорядоченные структуры	32.4 $\pm$ 0.5	32.9 $\pm$ 0.6	30.6 $\pm$ 0.6	32.3 $\pm$ 0.5



**Рис. 4.** Анализ устойчивости EwA (a) и RrA (b), а также их ПЭК к действию трипсина. Условия реакции: 37°C, 10 мМ PBS, 0.0025 мг/мл трипсина.

**Fig. 4.** Analysis of the resistance of EwA (a) and RrA (b) as well as their PECs to the trypsin action. Reaction conditions: 37°C, 10 mM PBS, 0.0025 mg/mL trypsin.

линейной зависимостью в полулогарифмических координатах, из чего следует, что инактивация проходит по механизму реакции первого порядка – без агрегации. Однако для нативной формы EwA спрямление наблюдается только на первых 10 мин. Значения констант инактивации реакции трипсинолиза образцов суммированы в табл. 5. Константы инактивации ПЭК EwA и RrA оказались в 2 раза ниже, чем для нативных ферментов. Полученные данные свидетельствуют о том, что и хитозан, и ПЭИ эффективно экранируют белок и защищают от действия трипсина.

Таким образом, выбранные поликатионы: хитозан и ПЭИ – способствуют повышению стабильности ферментов в заданных условиях. Они по-разному влияют на активность и стабильность EwA и RrA в зависимости от состава и молекулярной архитектуры полиэлектролита. В случае EwA все полиэлектролиты, кроме ПЭИ, оказывали стабилизирующее влияние на фермент и препятствовали денатурации и агрегации, хотя в ряде случаев наблюдалось снижение исходной каталитической активности при комплексообразовании. Механизмы инактивации молекулы RrA,

по-видимому, из-за небольшого размера, совсем другие. На этот фермент хитозан оказывал дестабилизирующий эффект, вероятно, за счет снижения подвижности белковой глобулы. В то же время ПЭИ увеличивал активность и стабилизировал фермент при повышенных температурах. Сходное увеличение активности в присутствии аминокрупп для RrA ранее обнаружено в Tris-содержащем буферном растворе [18]. Хитозан-ПЭГ, как и в случае EwA, стабилизировал фермент, что подтверждает вывод о необходимости ПЭГилирования хитозана для достижения оптимального влияния на фермент и снижения денатурирующего действия сильного полиэлектролита.

Стабилизированные препараты L-аспарагиназ в перспективе могут найти применение как лекарственные средства в терапии лейкозов. В отличие от нативных ферментов их полиэлектролитные комплексы будут обладать пролонгированным действием – за счет стабилизации поликатионами. Кроме того, на примере ПЭГилированной L-аспарагиназы показано снижение иммуногенности по сравнению с немодифицированным ферментом. А это очень важный фактор в преодолении возникновения аллергических реакций на препарат. Использование полиэлектролитов, таких как сополимеры хитозана, а также ПЭИ, позволяет эффективно изменять физико-химические свойства разных L-аспарагиназ и повышать их стабильность, что важно для разработки лекарственных препаратов нового поколения.

Работа выполнена с использованием ИК-Фурье спектрометра Tensor 27 Bruker (Bruker Optik GmbH, Германия) и спектрометра кругового дихроизма Jasco J-815 (Jasco, Япония) при поддержке программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.

**Таблица 5.** Константы инактивации препаратов EwA и RrA в реакции трипсинолиза

**Table 5.** Inactivation constants of EwA and RrA preparations in the trypsinolysis reaction

Образец	$k_{ин}, \text{мин}^{-1}$
EwA	$0.15 \pm 0.01$
EwA + хитозан	$0.075 \pm 0.001$
RrA	$0.022 \pm 0.002$
RrA + ПЭИ	$0.011 \pm 0.001$

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Juluri K.R., Siu C., Cassaday R.D. Asparaginase in the treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults: current evidence and place in therapy. *Blood Lymphat. Cancer*, 2022, 12, 55–79. <https://doi.org/10.2147/BLCTT.S342052>
2. Medawar C.V., Mosegui G.B.G., Vianna C.M.M., Costa T.M.A. PEG-asparaginase and native *Escherichia coli* L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: a systematic review. *Hematol. Transfus. Cell Ther.*, 2020, 42, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2019.01.013>
3. Vrooman L.M., Supko J.G., Neuberg D.S., Asselin B.L., Athale U.H., Clavell L., Kelly K.M., Laverdière C., Michon B., Schorin M., Cohen H.J., Sallan S.E., Silverman L.B. Erwinia asparaginase after allergy to *E. coli* asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer*, 2010, 54, 199–205. <https://doi.org/10.1002/pbc.22225>
4. Duval M., Suciú S., Ferster A., Rialland X., Nelken B., Lutz P., Benoit Y., Robert A., Manel A.M., Vilmer E., Otten J., Philippe N. Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer – Children’s Leukemia Group Phase 3 trial. *Blood*, 2002, 99, 2734–2739. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.8.2734>
5. Borisova A.A., El’darov M.A., Zhgun A.A., Aleksandrova S.S., Omel’ianiuk N.M., Sokov B.N., Berezov T.T., Sokolov N.N. Purification and properties of recombinant *Erwinia carotovora* L-asparaginase expressed in *E. coli* cells. *Biomed. Khim.*, 2003, 49, 502–507.
6. Abakumova O.Y., Podobed O. V., Karalkin P.A., Kondakova L.I., Sokolov N.N. Antitumor activity of L-asparaginase from *Erwinia carotovora* against different human and animal leukemic and solid tumor cell lines. *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.*, 2012, 6, 307–316. <https://doi.org/10.1134/S1990750812040026>
7. Kudryashova E.V., Suhoverkov K.V., Sokolov N.N. PEG-chitosan branched copolymers to improve the biocatalytic properties of *Erwinia carotovora* recombinant L-asparaginase. *Biomed. Chem.*, 2015, 61, 480–487. <https://doi.org/10.18097/PBMC20156104480>
8. Sukhoverkov K.V., Sokolov N.N., Abakumova O.Y., Podobed O.V., Kudryashova E.V. The formation of conjugates with PEG–chitosan improves the biocatalytic efficiency and antitumor activity of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, 2016, 71, 122–126. <https://doi.org/10.3103/S0027131416020073>
9. Sukhoverkov K.V., Kudryashova E.V. PEG–chitosan and glycol–chitosan for improvement of biopharmaceutical properties of recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, 80, 113–119. <https://doi.org/10.1134/S0006297915010137>
10. Pokrovskaya M.V., Pokrovskiy V.S., Aleksandrova S.S., Anisimova N.Y., Andrianov R.M., Treschalina E.M., Ponomarev G.V., Sokolov N.N. Recombinant intracellular *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase with low L-glutaminase activity and antiproliferative effect. *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.*, 2012, 6, 123–131. <https://doi.org/10.1134/S1990750812020096>
11. Deygen I.M., Kudryashova E.V. Structure and stability of anionic liposomes complexes with PEG–chitosan branched copolymer. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2014, 40, 547–557. <https://doi.org/10.1134/S1068162014050057>
12. Deygen I.M., Kudryashova E.V. New versatile approach for analysis of PEG content in conjugates and complexes with biomacromolecules based on FTIR spectroscopy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2016, 141, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.030>
13. Kudryashova E.V., Sukhoverkov K.V. “Reagent-free” L-asparaginase activity assay based on CD spectroscopy and conductometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, 408, 1183–1189. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9222-0>
14. Malakhova M.A., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Sokolov N.N., Kudryashova E.V. Regulation of catalytic activity of recombinant L-asparaginase from *Rhodospirillum rubrum* by conjugation with a PEG–chitosan copolymer. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, 2018, 73, 185–191. <https://doi.org/10.3103/S0027131418040065>
15. 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., Arshakov A.I. Bacterial recombinant L-asparaginases: properties, structure and anti-proliferative activity. *Biomed. Chem.*, 2015, 61, 312–324. <https://doi.org/10.18097/PBMC20156103312>
16. Mezentshev Y.V., Molnar A.A., Gnedenko O.V., Krasotkina Y.V., Sokolov N.N., Ivanov A.S. Oligomerization of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.*, 2007, 1, 58–67. <https://doi.org/10.1134/S199075080701009X>
17. Dobryakova N.V., Zhdanov D.D., Sokolov N.N., Aleksandrova S.S., Pokrovskaya M.V., Kudryashova E.V. Improvement of biocatalytic properties and cytotoxic activity of L-asparaginase from *Rhodospirillum rubrum* by conjugation with chitosan-based cationic polyelectrolytes. *Pharmaceuticals*, 2022, 15, 406. <https://doi.org/10.3390/ph15040406>
18. Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Pokrovskiy V.S., Veselovsky A.V., Grishin D.V., Abakumova O.Y., Podobed O.V., Mishin A.A., Zhdanov D.D., Sokolov N.N. Identification of functional regions in the *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase by site-directed mutagenesis. *Mol. Biotechnol.*, 2015, 57, 251–264. <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9819-0>

## Stabilization of *Erwinia carotovora* and *Rhodospirillum rubrum* L-Asparaginases in Complexes with Polycations

N. D. Dobryakova<sup>a</sup>, and E. V. Kudryashova<sup>a, #</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>#</sup>e-mail: helenakoudriachova@yandex.ru

**Abstract**—The effect of chitosan copolymers and polyethyleneimine (PEI) on the specific activity of L-asparaginases of *Erwinia carotovora* (EwA) and *Rhodospirillum rubrum* (RrA) at different pH values, as well as the influence of polycations on the mechanisms of thermal inactivation and trypsinolysis of enzymes has been studied. Using circular dichroism spectroscopy, the catalytic activities of polyelectrolyte complexes (PEC) were determined, as well as changes in the structure of native enzymes before and after incubation at elevated temperatures. For most PECs, the pH optimum was shifted by 0.5 units towards more acidic values due to the polycationic nature of the polyelectrolytes. The inactivation of EwA and its complexes was found to be associated predominantly with aggregation, while RrA underwent denaturation without aggregation. A stabilizing effect of complex formation was observed: the EwA aggregation was slowed down as a result of the formation of PECs with chitosan and its copolymers. The effect of chitosan in stabilizing EwA upon heating was higher than that of RrA. PEC of RrA with PEI turned out to be optimal: the first-order thermal inactivation constant was decreased by 2.2 times compared to the native enzyme, and the inactivation constant during trypsinolysis was reduced twofold. The chitosan-PEG complexation made it possible to maintain or even increase the high level of catalytic activity of the enzymes with simultaneous increasing their thermostability.

**Keywords:** L-asparaginase, *Erwinia carotovora*, *Rhodospirillum rubrum*, polyelectrolyte complexes, thermal stability