

УДК 577.112; 577.151; 579.66; 616.15

Рекомбинантная α -N-ацетилгалактозаминидаза морской бактерии, модифицирующая детерминанты A-эритроцитов

Л. А. Балабанова^{1,2*}, В. А. Голотин¹, И. Ю. Бакунина¹, Л. В. Слепченко¹, В. В. Исаков¹, А. Б. Подволоцкая², В. А. Рассказов¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостоку, 159

²Дальневосточный федеральный университет, 690950, Владивосток, ул. Суханова, 8

*E-mail: balaban@piboc.dvo.ru

Поступило в редакцию 14.11.2014

РЕФЕРАТ На основе рЕТ-40b сконструирована плаزمида, определяющая синтез рекомбинантной α -N-ацетилгалактозаминидазы морской бактерии *Arenibacter latericius* КММ 426^T (α -AlNaGal) в клетках *Escherichia coli*. В условиях экспрессии при температуре 16°C, концентрации индуктора 0.2 мМ и культивирования в течение 12 ч выход α -AlNaGal достигает 10 мг/л с общей активностью 49.7 ± 1.3 U. Разработаны процедуры очистки α -AlNaGal с использованием анионообменной, металлоаффинной хроматографии и гель-фильтрации. α -AlNaGal представляет собой гомодимер с молекулярной массой 164 кДа, стабильна до 50°C с температурным оптимумом реакции при 20–37°C, и ее активность не зависит от присутствия ионов металлов в инкубационной среде. Методом ¹H-ЯМР-спектроскопии показано, что α -AlNaGal катализирует гидролиз O-гликозидной связи с сохранением стереохимической конфигурации аномерного атома и реализует механизм, характерный для семейства 109 гликозидгидролаз. α -AlNaGal снижает серологическую активность A-эритроцитов при pH 7.3, что делает ее в перспективе пригодной для конверсии A- и АВ-эритроцитов в эритроциты группы крови O.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гликозидгидролаза GH109, *Arenibacter latericius*, ¹H-ЯМР-спектроскопия, конверсия A-эритроцитов.

ВВЕДЕНИЕ

α -N-Ацетилгалактозаминидазы [К.Ф. 3.2.1.49] катализируют отщепление 2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-галактопиранозильных остатков, связанных α -O-гликозидной связью (GalNAc α), от невосстанавливающих концов олигосахаридов и гликоконъюгатов, в частности агглютиногенов групп крови человека A и АВ. α -N-Ацетилгалактозаминидазы используются для изучения структуры природных соединений и синтеза новых олигосахаридов [1]. Изучение α -N-ацетилгалактозаминидаз обусловлено также их участием в катаболизме сложных олигосахаридов в организме человека [2]. Практический интерес к ферменту возник в связи с возможностью его использования для конверсии крови групп A и АВ в универсальную кровь группы O путем дегликозилирования антигенных детерминант [3]. С этой целью были выделены гликозидгидролазы семейства 27 (GH27) из печени курицы и семейства 36 (GH36)

из бактерии *Clostridium perfringens* [4, 5]. Они имели ряд недостатков для биотехнологического использования, таких, как нефизиологический pH-оптимум и неэффективность в отношении эритроцитов подгруппы A₁.

В результате скрининга 3000 штаммов морских бактерий у *Arenibacter latericius* КММ 426^T обнаружили α -N-ацетилгалактозаминидазу, которая при нейтральных значениях pH эффективно инактивировала серологическую активность A₁- и A₂-антигенов эритроцитов [6, 7]. Согласно классификации по структурной гомологии α -N-ацетилгалактозаминидаза *A. latericius* КММ 426^T была отнесена к гликозидгидролазам семейства 109 (GH109) [8, 9].

В данной работе предложен способ получения рекомбинантной α -N-ацетилгалактозаминидазы (α -AlNaGal) для исследования ее ферментативных свойств.

Нуклеотидная последовательность гена α -AlNaGal была амплифицирована с хромосомной ДНК морской бактерии *A. latericius* КММ 426^T с помощью праймеров: Nac40_NcoI: 5'-ТТААССАТGGAAAАТСТТТА-ТТТТСАGGGTGGGGCTAAGTACATGGGCGGTTT-ТТСТГСТ-3', и Nac40_SalI: 5'-ТТАAGTСGA-САССТGAAAАТААAGАТТТТСГСТТАСААТ-АТСТААТGGTGCAGTGGT-3' («Евроген»). ПЦР проводили в амплификаторе Eppendorf по схеме: 95°C – 2 мин и 35 циклов 95°C – 15 с, 72°C – 1 мин. Ген α -AlNaGal клонировали в векторе pET-40b(+) (Novagen) по сайтам рестрикции NcoI и SalI после последовательности DsbC и His-tag. Рекомбинантные плазмиды получали в клетках *Escherichia coli* DH5 α . Штамм-продуцент α -AlNaGal получали путем трансформации плазмиды в клетки *E. coli* Rosetta(DE3). Ночную культуру штамма-продуцента выращивали в колбе (1 л) с жидкой средой LB (pH 7.7), содержащей 25 мг/мл канамицина, на шейкере (200 об/мин, 37°C), до OD₆₀₀ = 0.6–0.8, затем добавляли 0.2 мМ изопропил- β -D-тиогактопиринозид (ИПТГ) и инкубировали при 16°C в течение 12 ч.

Активность α -AlNaGal определяли по расщеплению *n*-нитрофенил- α -N-ацетилгалактозаминида. Реакционная смесь (400 мкл) содержала 10 мМ NaH₂PO₄, pH 7.2, 3 мМ субстрата и фермент. После 20 мин инкубации при 20°C реакцию останавливали добавлением 0.6 мл 1 М Na₂CO₃. Количество образовавшегося продукта реакции определяли при 400 нм. За единицу активности (U) принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкМ *n*-нитрофенола за 1 мин. Удельную активность выражали в единицах активности фермента на 1 мг белка. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд. Выход общей активности с 1 л культуры составлял 49.7 ± 1.3 U.

Очистку α -AlNaGal проводили при +6°C. Клетки *E. coli* центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об/мин, ресуспендировали в 200 мл буфера А (0.01 М NaH₂PO₄, pH 7.8, 0.01% NaN₃) и озвучивали на УЗДН 2-Т. Раствор центрифугировали (25 мин, 11000 об/мин) и наносили на уравновешенную буфером А колонку (2.5 × 37 см) с ионообменной смолой DEAE-MacroPrep (Bio-Rad). Элюцию проводили линейным градиентом 0–0.25 М NaCl в буфере А. Активные фракции собирали и наносили на колонку (1 × 2 см) с Ni-агарозой (Qiagen). Белок элюировали 50 мМ EDTA. Элюат подвергали гель-фильтрации на колонке (1.5 × 170 см) с сефакрилом S-200HR (Sigma), уравновешенной в буфере А. Гомогенность препарата α -AlNaGal определяли в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ-электрофорез) (рис. 1). По результатам гель-фильтрации α -AlNaGal является гомодимером

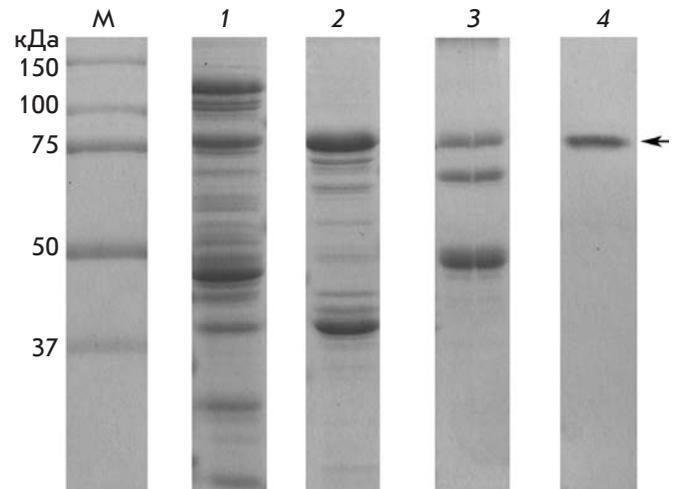


Рис. 1. Экспрессия и очистка α -AlNaGal в ДСН-ПААГ (12%): М – маркер молекулярной массы белков (Bio-Rad); 1 – клеточный экстракт; 2 – DEAE-MacroPrep; 3 – Ni-агароза; 4 – Sephacryl S-200HR. Стрелкой указана область миграции α -AlNaGal

с молекулярной массой 164 или 96 кДа после удаления плазмидной последовательности DsbC по сайту энтерокиназы (Novagen). Фермент стабилен до 50°C с температурным оптимумом при 20–37°C, его активность не зависит от присутствия ионов металлов в инкубационной среде. Дополнительные аминокислотные остатки не оказывали влияния на ферментативные свойства α -AlNaGal, поэтому стадией их удаления можно пренебречь. Оптимум pH определяли в 20 мМ Na⁺-фосфатном и глицин-NaOH-буферах в интервалах 5.4–8.2 и 8.0–10.0 (рис. 2А). Изучение свойств α -AlNaGal показало возможность ее использования для дегликозилирования групповых детерминант А-эритроцитов крови (станция переливания крови, Владивосток) при нейтральных значениях pH. Отмытые физиологическим раствором А-эритроциты доводили изотоническим Na⁺-фосфатным буфером до концентрации 20%, 0.02 мл полученной суспензии смешивали с 0.08 мл раствора α -AlNaGal (0.004 U) в том же буфере. После 24 ч инкубации при 26°C эритроциты отмывали 3 раза с легким перемешиванием в том же буфере (pH 7.3), и готовили 1% суспензию, затем смешивали с анти-А-сывороткой (ООО «Медиклон», Россия) в сериях двойных разведений на 96-луночных планшетах (Costar). Спустя 1 ч инкубации при комнатной температуре считывали титр агглютинации (рис. 2Б). Результаты иммунологического анализа показали, что серологическая активность А-антигенов эритроцитов, обработанных α -AlNaGal, снизилась

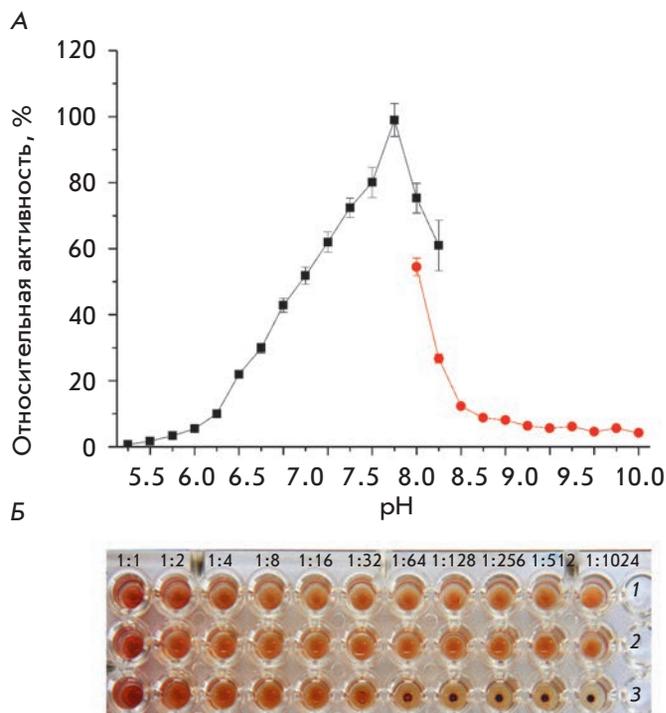


Рис. 2. Ферментативные свойства α -A/NaGal: А – pH-оптимум α -A/NaGal; Б – 1% суспензия А-эритроцитов, смешанных с анти-А-сывороткой, в сериях двойных разведений: 1 – в 20 мМ Na⁺-фосфатном буферном растворе, 2 – в 20 мМ глицин-NaOH-буферном растворе, 3 – в 20 мМ Na⁺-фосфатном буферном растворе после обработки α -A/NaGal

в результате их ферментативной трансформации в Н-антигены, так как агглютинации не наблюдается до титра 1/16. α -A/NaGal не вызывает неспецифической агрегации эритроцитов и их гемолиза.

По способности полностью инактивировать серологическую активность А-эритроцитов при нейтральных значениях pH фермент из морской бактерии *A. latericius* КММ 426^T выгодно отличается от α -N-ацетилгалактозаминидаз из печени цыпленка и *S. perfringens*, действующих только на А₂-эритроциты [5, 6]. Ферменты GH27 и GH36, как классические гликозидгидролазы, катализируют гидролиз О-гликозидной связи субстрата по механизму двойного замещения с сохранением оптической конфигурации аномерного центра субстрата [10]. Позднее из патогенной бактерии *Elizabethkingia meningoseptica* был выделен фермент нового семейства GH109, подобный по свойствам α -N-ацетилгалактозаминидазе *A. latericius* КММ 426^T, но имеющий иной механизм гидролиза [8]. Этот механизм включал стадии элиминирования

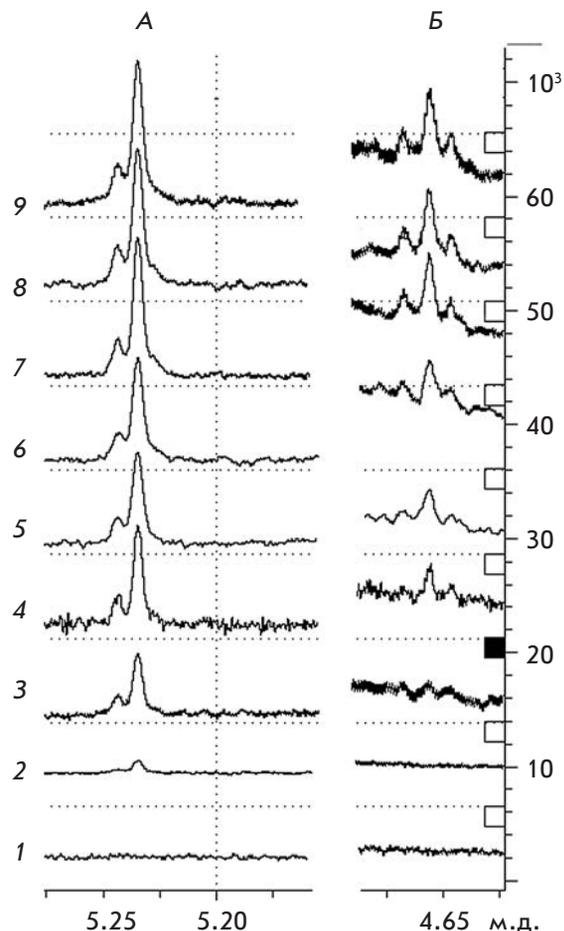


Рис. 3. Область резонанса $\Delta\delta = 5.30$ – 5.20 м.д. (А) и $\Delta\delta = 4.75$ – 4.10 м.д. (Б) α - и β -аномерных атомов ¹H-ЯМР-спектра продукта гидролиза α -A/NaGal – N-ацетилгалактозамина, в течение 0 (1), 10 (2), 20 (3), 30 (4), 40 (5), 50 (6), 80 (7), 90 (8), 100 мин (9)

О-гликозидной связи и обмен протона во втором положении N-ацетилгалактозамина с сохранением аномерной конфигурации.

Прямое наблюдение конфигурации аномерного центра продуктов гидролиза α -A/NaGal осуществляли с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии. Эксперимент проводили при 20°C с использованием ЯМР DRX-500-спектрометра (Bruker). ¹H-ЯМР-спектры были получены при ширине 5000 Гц, TD – 32000. Перед анализом 0.6 мл 50 мМ Na⁺-фосфатного раствора, pH 7.5, содержащего 6.0 мМ субстрата *n*-нитрофенил-N-ацетилгалактозаминида, высушивали на роторном испарителе и растворяли в 0.6 мл D₂O. Дейтерированную α -A/NaGal получали на колонках Vivaspin турбо 10 К MWCO (Sartorius). Химические сдвиги в спектре измеря-

ли по отношению к внутреннему стандарту – ацетону ($\delta = 2.22$ м.д.) в D_2O . После записи исходного спектра субстрата при $\tau = 0$ мин к 6.0 мМ дейтерированного *n*-нитрофенилгалактозаминида в 0.6 мл D_2O для иницирования реакции добавляли 0.1 мл дейтерированной α -AlNaGal, содержащей 0.98 U. 1H -ЯМР-спектры регистрировали автоматически с интервалом в 10 мин в течение 180 мин от начала реакции. На рис. 3 представлены области резонанса $\Delta\delta = 5.30$ –5.20 м.д. и $\Delta\delta = 4.75$ –4.10 м.д. 1H -ЯМР-спектра продуктов реакции. В течение первых минут после добавления фермента появляется продукт, имеющий резонансный сигнал с химическим сдвигом при 5.22 м.д. (рис. 3А). Этот сигнал соответствует протону аномерного центра свободного α -N-ацетилгалактозамина (GalNAc α). Интенсивность сигнала увеличивается в течение следующих 10 мин реакции. Сигнал β -аномера GalNAc α с химическим сдвигом 4.64 м.д. как результат мутаротации становится заметным спустя 20 мин от начала реакции (рис. 3Б). Как видно из спектра α - и β -аномеров сво-

бодного GalNAc α сигналы проявляются в виде дублетов с КССВ $J = 3.8$ и 7.8 Гц и синглета, что указывает на замещение протона дейтерием по атому С2, что характерно для гликозидгидролаз GH109 [8, 11].

ВЫВОДЫ

Получен рекомбинантный белок α -AlNaGal с молекулярной массой 164 кДа, обладающий свойствами α -N-ацетилгалактозаминидазы морской бактерии *A. latericius* КММ 426^T. α -AlNaGal катализирует гидролиз α -O-гликозидной связи с сохранением оптической конфигурации аномерного центра субстрата и обменом протона при С2 на дейтерий растворителя по типу гликозидгидролаз GH109. α -AlNaGal дегликозилирует А-антигены крови при pH 7.5, что делает ее в перспективе пригодной для получения эритроцитов группы крови O. ●

Работа поддержана РФФИ (грант № 13-04-00806) и Научным фондом ДВФУ (14-08-06-10_и).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vallée F, Karaveg K, Herscovics A, Moremen K.W, Howell P.L. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 52. P. 41287–41298.
- Keulemans J.L.M., Reuser A.J.J., Kroos M.A., Willemsen R., Hermans M.M.P., van den Ouweland A.M.W., de Jong J.G.N., Wevers R.A., Renier W.O., Schindler D., et al. // J. Med. Genet. 1996. V. 33. № 6. P. 458–464.
- Olsson M.L., Hill C.A., de la Vega H., Liu Q.P., Stroud M.R., Valdinocci J., Moon S., Clausen H., Kruskall M.S. // Transfus. Clin. Biol. 2004. V. 11. № 1. P. 33–39.
- Hata J., Dhar M., Mitra M., Harmata M., Haibach P., Sun P., Smith D. // Biochem. Int. 1992. V. 28. № 1. P. 77–86.
- Hsieh H.Y., Smith D. // Biotechnol. Appl. Biochem. 2003. V. 37. № 2. P. 157–163.
- Иванова Е.П., Бакунина И.Ю., Недашковская О.И., Горшкова Н.М., Михайлов В.В., Елякова Л.А. // Биология моря. 1998. Т. 24. № 6. С. 351–358.
- Бакунина И.Ю., Кульман Р.А., Лихошерстов Л.М., Мартынова М.Д., Недашковская О.И., Михайлов В.В., Елякова Л.А. // Биохимия. 2002. Т. 67. № 6. С. 830–837.
- Liu Q.P., Sulzenbacher G., Yuan H., Bennett E.P., Pietz G., Saunders K., Spence J., Nudelman E., Lavery S.B., White T., et al. // Nat. Biotechnol. 2007. V. 25. № 4. P. 454–464.
- Bakunina I., Nedashkovskaya O., Balabanova L., Zvyagintseva T., Rasskasov V., Mikhailov V. // Mar. Drugs. 2013. V. 11. P. 1977–1998.
- Comfort D.A., Bobrov K.S., Ivanen D.R., Shabalin K.A., Harris J.M., Kulminskaya A.A., Brumer H., Kelly R.M. // Biochemistry. 2007. V. 46. № 11. P. 3319–3330.
- Chakladar S., Abadib S.S.K., Bennet A.J. // Med. Chem. Commun. 2014. V. 5. P. 1188–1192.