

$$\text{Центральная линия} = \frac{1}{n} \sum_1^n x, \quad (5)$$

$$\text{Верхняя контрольная линия} = \text{центральная линия} + 2,660 * \overline{mR}, \quad (6)$$

$$\text{Нижняя контрольная линия} = \text{центральная линия} - 2,660 * \overline{mR}, \quad (7)$$

где x – это конкретное измерение в рамках проведения контроля качества, n – это общее количество измерений, и

$$\overline{mR} = \frac{1}{n-1} \sum_{i=2}^n |x_i - x_{i-1}| \quad (8)$$

– диапазон смещения.

В этой процедуре контрольные линии используются как диапазон значений допуска. Установление управления процессом является ключевым элементом этой процедуры, потому что контролируемый процесс является показателем того, что процедура стабильна и пригодна для целей QA IMRT планов. Использование предложенной процедуры требует несколько иного подхода к пониманию QA, т.к. этот подход понимает QA как совокупность процессов (люди + оборудование + процедуры), а не просто как сумму аппаратуры и программного обеспечения. Важно отметить, что полученные значения допусков будут зависеть от сложности плана из-за большей изменчивости измерений в зависимости от локализации. Следовательно, будет целесообразно рассчитывать допуски отдельно для случаев с высокой сложностью плана и для случаев с низкой сложностью плана, например, для планов головы и шеи в сравнении с планами лечения предстательной железы [4].

Последний шаг в процедуре – сравнить допуски с уровнями действия. Например, если допуски по γ -индексу ниже уровней действия, то либо необходимо пересмотреть процедуру их получения, либо уменьшить уровни действия (т. е. использовать большее значение β в уравнении (4)). Также для исправления процесса может потребоваться новое или модифицированное оборудование, обучение персонала, выполняющего измерения и анализ результатов измерений в рамках QA. Использование этой стандартизированной процедуры для установления уровней действия и допусков позволит медицинским физикам сравнивать процессы контроля качества в разных учреждениях.

ЛИТЕРАТУРА

1. American Association of Physicists in medicine Radiation Therapy Committee Task Group 53: quality assurance for clinical radiotherapy treatment planning / B. Fraass [et al.] // Medical Physics. – 1998. – Vol. 25, № 10. – P. 1773–1829.
2. Intensity-modulated radiation therapy dose prescription, recording, and delivery: patterns of variability among institutions and treatment planning systems / J. Das [et al.] // Journal of the National Cancer Institute. – 2008. – Vol. 100, № 17. – P. 300–307.
3. A method of setting limits for the purpose of quality assurance / T. Sanghangthum [et al.] // Physics in Medicine and Biology. – 2013. – Vol. 58, № 19. – P. 7025–7037.
4. Tolerance limits and methodologies for IMRT measurement-based verification QA: Recommendations of AAPM Task Group No. 218 / M. Miften [et al.] // Medical Physics. – 2018. – Vol. 45, № 4. – P. 53–83.
5. A comprehensive analysis of the IMRT dose delivery process using statistical process control (SPC) / K. Gerard [et al.] // Medical Physics. – 2009. – Vol. 36, № 4. – P. 1275–1285.

СОЗДАНИЕ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА СЛИТОГО БЕЛКА ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗА-АННЕКСИН А5 CREATION OF A STRAIN PRODUCER OF FUSED PROTEIN PURIN NUCLEOSIDE PHOSPHORHYLASE-ANXEXIN A5

А. Б. Булатовский¹, А. И. Зинченко^{1,2}

A. Bulatovski¹, A. Zinchenko^{1,2}

¹Институт Микробиологии НАН Беларуси,

г. Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,

г. Минск, Республика Беларусь

a.bulatovski@yandex.by

¹Institute of Microbiology NAS Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Известно, что бактериальная пурииннуклеозидфосфорилаза (далее – ПНФаза), в отличие от ПНФазы млекопитающих, способна подвергать фосфоролитическому расщеплению аденозин и его производные с образованием свободных азотистых оснований. Это позволяет использовать ПНФазу бактерий (при условии решения проблемы доставки этого фермента или его гена в клетки-мишени) в качестве пролекарственной терапии рака. Кроме того, ПНФаза в ложе опухоли может разрушать внеклеточный аденозин, который как известно, защищает раковые клетки от противоопухолевого иммунитета.

В результате проведенного исследования сконструирован новый штамм *Escherichia coli*, продуцирующий слитый (химерный) белок, молекула которого состоит из гомологичной пурииннуклеозидфосфорилазы (ПНФазы), слитой с человеческим аннексином-A5 – белком, проявляющим сродство к раковым клеткам.

It is known that bacterial purinnucleoside phosphorylase (PNPase), unlike mammalian PNPase, is capable of phosphorolytic cleavage of adenosine and its derivatives to form free nitrogen bases. This makes it possible to use PNPase bacteria (provided the problem of delivering this enzyme or its gene to target cells is solved) as a prodrug therapy for cancer. In addition, PNPase in a tumor bed can destroy extracellular adenosine, which as it is known protects cancer cells from antitumor immunity.

As a result of the study, a new strain of *Escherichia coli* was constructed, producing a fusion (chimeric) protein whose molecule consists of a homologous purine nucleoside phosphorylase (PNPase) fused to human annexin A5, a protein showing affinity for cancer cells.

Ключевые слова: рекомбинантный штамм, химерный белок, человеческий аннексин-A5, пурииннуклеозидфосфорилаза, *Escherichia coli*.

Keywords: fusion protein, chimeric protein, human annexin, purine nucleoside phosphorylase, *Escherichia coli*.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-36-39>

Известно, что пурииннуклеозидфосфорилаза (ПНФаза) бактерий, в отличие от аналогичного фермента человека и животных, способна катализировать реакцию фосфоролитического расщепления молекулы аденозина и его структурных аналогов на сахарофосфат и азотистое основание [1].

В научной литературе отмеченную особенность бактериальной ПНФазы предложено использовать в качестве элемента так называемой «суицидальной генотерапии» рака [2]. Этот терапевтический подход предусматривает введение гена, кодирующего ПНФазу *Escherichia coli*, в клетки опухоли с последующим превращением с помощью этого фермента, например, слаботоксичного арабинофуранозил-2-фтораденина (пролекарство, в губительную для клеток субстанцию – 2-фторадеинин [3].

Нами ранее [4] экспериментально обоснована возможность использования рекомбинантных ферментов для получения арабинофуранозил-2-фтораденина. Для создания отечественной пролекарственной ферментной технологии, аналогичной описанной выше, необходимо решить проблему доступности и доставки бактериальной ПНФазы в опухолевые клетки-мишени.

Ж. Крайс с соавт. [2] предложили доставлять бактериальную ПНФазу в опухоли в форме ее химического конъюгата с аннексином A5 – человеческим белком, проявляющим сродство к фосфатидилсерину – липиду, выстилающему поверхность опухолевых клеток [5]. Для реализации этого предложения авторами был создан относительно слабоактивный рекомбинантный штамм бактерий, продуцирующих ПНФазу *E. coli*, слитую с аннексином A5, и продемонстрирована успешная доставка фермента в клетки ряда злокачественных опухолей. Продуцирующая способность этого штамма в отношении химерного белка, измеренная по активности ПНФазы, составила 2,1 ед/мл культуральной жидкости. По нашему мнению, невысокая продуктивность этого штамма обусловлена недостаточно эффективной системой экспрессии генов, использованной авторами цитируемой статьи.

Цель настоящего исследования – создание нового, высокоактивного штамма *E. coli*, продуцирующего гомологичную ПНФазу, слитую с человеческим аннексином A5.

Источником структурного гена *anxA5*, кодирующего аминокислотную последовательность человеческого аннексина-A5 (далее – аннексин) – служила плаزمида pET12-PAP1 («Addgene», США). Ген ПНФазы *deoD* был выделен из геномной ДНК *E. coli* BL21(DE3) («Novagen», США). Геномную ДНК и плазмиду выделяли из клеток бактерий с помощью стандартного метода фенол-хлороформной экстракции с дополнительной очисткой при помощи цетавлона. Для дальнейшего выделения генов использовали полимеразную цепную реакцию (далее – ПЦР) и специально подобранные олигонуклеотидные праймеры (представлены в таблице).

Таблица – Последовательности олигонуклеотидных праймеров

Праймер	Назначение праймера
deoD-F (5'-GTGGTGGTCCACAACGCTACCCCA-CACATTAATG-3')	Прямой праймер для амплификации гена <i>deoD</i> .
deoD-R (5'-GATCCAGAACCGAGCCCTCTTTATC-GCCCAGCAG-3')	Обратный праймер для амплификации гена <i>deoD</i> , содержит линкерный участок (подчеркнут).
anxA5-F (5'-GGTCCGGTTCTGATCCACAGGT-TCTCAGAGGCA-3')	Прямой праймер для амплификации гена <i>anxA5</i> , содержит линкерный участок (подчеркнут).
anxA5-R (5'-GGTGATGGTGATGCTCGTCATCTT-CTCCACAGAGCAG-3')	Обратный праймер для амплификации гена <i>anxA5</i> .

Полученные гены *anxA5* и *deoD* и плаزمида pET42a(+) («Novagen», США) были собраны в одну генетическую конструкцию (обозначенную как pET42a-PNP-AnxA5) методом продолжительной перекрывающейся ПЦР.

Для предотвращения стерических препятствий, затрудняющих функционирование слитых белков, между их генами в плазмиде был вставлен участок ДНК (размером 18 пар оснований), кодирующий олигопептид, состоящий из поочередно повторяющихся аминокислотных остатков глицина и серина.

Путем последующей трансформации этой плазмидой клеток *E. coli* «Rosetta 2» фирмы «Merck» (Германия), был получен рекомбинантный штамм бактерий *E. coli* AD19 – продуцент химерного белка «Аннексин-ПНФаза».

Клетки-трансформанты культивировали в жидкой питательной среде Luria-Bertani при 37°C до оптической плотности 0,5 при λ 600 нм, после чего индуцировали синтез химерного белка внесением в среду изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) в конечной концентрации 0,2 мМ.

Активность ПНФазы химерного белка определяли по скорости фосфорилиза инозина [2]. Анализ процентного содержания целевого белка в клетках проводили с использованием программы ImageLab («BioRad», США). За единицу активности ПНФазы принимали такое количество, которое обеспечивало фосфорилиз нуклеозида при 37°C со скоростью 1 мкмоль/мин.

Штамм *Escherichia coli* AD19 депонирован в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси под регистрационным номером БИМ В-1411 Д.

Анализ белкового состава клеточного лизата, а также очищенного химерного белка проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия (ДСН). Определение молекулярных масс белков, а также уровня экспрессии клонированных генов проводили с помощью программы ImageLab («BioRad», США). Содержание белка в образцах определяли методом M. Bradford. Приведенные в работе экспериментальные данные представляют собой доверительный интервал среднего арифметического для 95 % уровня вероятности.

Судя по результатам электрофоретического анализа клеточного лизата штамма *E. coli* AD19 в ДСН-полиакриламидном геле (рис. 1), химерный белок составляет более 67 % от содержащегося в клетках водорастворимого белка.

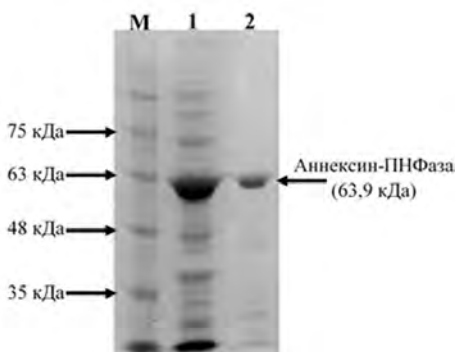


Рисунок 1 – Электрофореграмма в ДСН-полиакриламидном геле химерного белка до (1) и после (2) выделения из лизата клеток *E. coli* AD19. М – маркерные белки с известной молекулярной массой

Молекулярная масса этого белка составляет порядка 63,9 кДа, что соответствует теоретически рассчитанной для химерной конструкции, состоящей из аннексина (35,8 кДа), ПНФазы (26,5 кДа) и олигопептидного линкера (1,6 кДа).

Оптимизация параметров культивирования штамма-продуцента позволила установить, что максимальный уровень накопления химерного белка «Аннексин-ПНФаза» достигается к 4,5 ч после начала индукции его биосинтеза с помощью 0,2 мМ ИПТГ.

На следующем этапе работы осуществляли наработку клеточной биомассы и выделение из нее химерного белка. По окончании культивирования клетки осаждали центрифугированием при 15 000 g в течение 5 мин, дважды отмывали от питательной среды с помощью 0,15 М раствора NaCl, разрушали ультразвуком и выделяли целевой белок с помощью металло-аффинной хроматографии на колонке с Ni-NTA фирмы «GE Healthcare» (США). Чистота препарата по данным электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле (рис. 1) составила около 98%.

Продуцирующая способность штамма *E. coli* AD19 в отношении активности ПНФазы в составе химерного белка составила 10200 ед/мл культуральной жидкости.

Здесь необходимо указать на еще одну важную возможность практического применения полученного химерного белка. Согласно убедительным литературным данным, одним из ключевых факторов, ответственных за формирование иммуносупрессирующего микроокружения злокачественных опухолей является накапливающийся в них внеклеточный аденозин [5]. В связи с этим, ранее нами была высказана идея устранения защиты рака от противоопухолевого иммунитета с помощью аденозиндезаминазы, слитой с аннексином А5.

Поскольку бактериальная ПНФаза (также, как и аденозиндезаминаза) способна разрушать аденозин, полученный в ходе настоящего исследования химерный белок «Аннексин-ПНФаза», в принципе, может также

выполнять функцию разрушения внеклеточного аденозина, защищающего раковые клетки от противоопухолевого иммунитета пациента.

Способность ПНФазы, слитой с аннексином А5, катализировать разложение аденозина проверяли путем постановки следующей реакции:

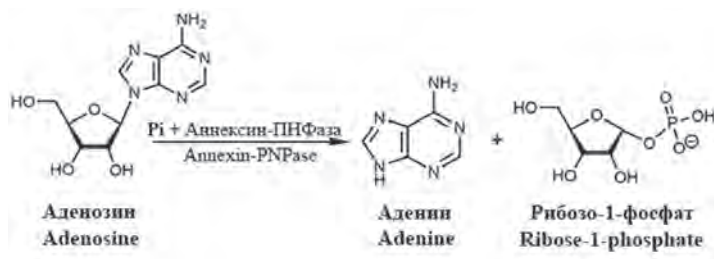


Рисунок 2 – Схема разложения аденозина под действием ПНФазы химерного белка «Аннексин-ПНФаза»

Продуцирующая способность штамма-продуцента этого белка в отношении ПНФазы, рассчитанная по результатам такого эксперимента, составила 10200 ± 200 ед/мл культуральной жидкости.

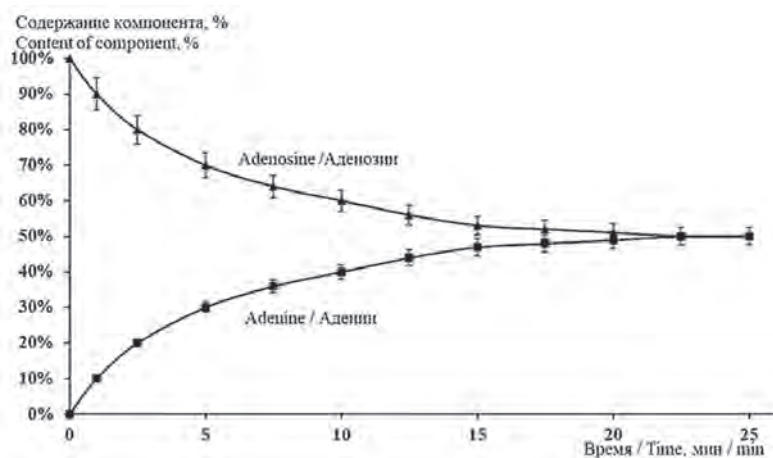


Рисунок 3 – Динамика убывания аденозина и накопления аденина в реакционной смеси

В результате выполненного исследования сконструирован новый рекомбинантный штамм *E. coli* AD19, продуцирующий ПНФазу, слитую с человеческим аннексином с молекулярной массой 63,9 кДа (что соответствует теоретически рассчитанной). При этом, продуцирующая способность штамма в отношении ПНФазы в составе химерного белка составляет 10200 ед/мл культуральной жидкости, что значительно превышает продуктивность известного из литературы штамма-аналога. Продуцируемый этим штаммом химерный белок «Аннексин-ПНФаза» имеет перспективу применения в качестве элементов новейших (оригинальных) противоопухолевых препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Expression, purification, and characterization of recombinant purine nucleoside phosphorylase from *Escherichia coli* / J. Lee [et al.] // Protein Expr. Purif. – 2001. – Vol. 22. – P.180–188.
2. Kraiss, J. J. Purine nucleoside phosphorylase targeted by Annexin V to breast cancer vasculature for enzyme prodrug therapy / J. J. Kraiss, O. De Crescenzo, R. G. Harrison // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, № 10. – e76403.
3. In vivo gene therapy of cancer with *E. coli* purine nucleoside phosphorylase / W. B. Parker [et al.] // Hum. Gene Ther. – 1997. – Vol. 8, № 14. – P. 1637–1644. [https://doi.org/10.1089/hum, 1997. 8.14-1637](https://doi.org/10.1089/hum.1997.8.14-1637)
4. Синтез флударабин-5'-монофосфата с использованием бактериальных рекомбинантных ферментов / А. И. Береснев [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – Т. 62, № 1. – С.7–15.
5. Sharma, B. Phosphatidylserine: a cancer cell targeting biomarker / B. Sharma, S. S. Kanwar // Semin. Cancer Biol. – 2018. – Vol. 52 (Pt 1). – P. 17–25.