

УДК 579.66:577.113.3:577.15

И. С. КАЗЛОВСКИЙ¹, Д. С. РАДЕВИЧ², А. Н. РЫМКО², А. С. ЩЕКОЛОВА²,
С. В. КВАЧ², А. И. ЗИНЧЕНКО^{1,2}

**СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* –
ПРОДУЦЕНТА ДИАДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
ДЛЯ СИНТЕЗА ЦИКЛО-ДИ-АМФ**

¹Международный государственный экологический университет им. А. Д. Сахарова, Минск, Беларусь,
e-mail: leonardo_139@mail.ru

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: zinch@mbio.bas-net.by

Сконструирован новый рекомбинантный штамм *Escherichia coli* pBtdac, продуцирующий диаденилатциклазу *Bacillus thuringiensis*. Количество диаденилатциклазы, продуцируемой этим штаммом, составляет 32 мг в 1 л культуральной жидкости. Изучена субстратная специфичность и стабильность полученного фермента. Продемонстрировано применение очищенной диаденилатциклазы для препаративного (600 мг) синтеза цикло-ди-АМФ.

Ключевые слова: диаденилатциклаза, цикло-ди-АМФ, *Escherichia coli*, рекомбинантный штамм, метод безлигазного клонирования.

I. S. KAZLOVSKIJ¹, D. S. RADEVICH², A. N. RYMKO², A. S. SHCHOKOLOVA², S. V. KVACH², A. I. ZINCHENKO^{1,2}

**CONSTRUCTION OF *ESCHERICHIA COLI* STRAIN, PRODUCING DI-ADENYLATE CYCLASE
AND ITS APPLICATION FOR CYCLIC DI-AMP SYNTHESIS**

¹Sakharov International State Ecological University, Minsk, Belarus, e-mail: leonardo_139@mail.ru

²Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus, e-mail: zinch@mbio.bas-net.by

A new recombinant strain of *Escherichia coli* pBtdac, producing diadenylate cyclase *Bacillus thuringiensis* has been constructed. The amount of the diadenylate cyclase produced by the strain is 32 mg per 1 L of culture broth. The substrate specificity and stability of the produced enzyme has been studied. Application of the purified diadenylate cyclase for preparative (600 mg) cyclic di-AMP synthesis has been demonstrated.

Keywords: diadenylate cyclase, cyclic di-AMP, *Escherichia coli*, recombinant strain, ligase-independent cloning technique.

Введение. Диаденилатциклаза (ДАЦ) – фермент, катализирующий синтез фармацевтически важного циклического 3',5'-диаденозинмонофосфата (цикло-ди-АМФ) из двух молекул АТФ. ДАЦ обнаружена у таких представителей бактерий, как *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Thermotoga maritima* [1, 2], *Listeria monocytogenes* [3], *Staphylococcus aureus* [4] и *Streptococcus pyogenes* [5].

Продукт реакции, катализируемой ДАЦ, – цикло-ди-АМФ. Он выполняет роль бактериальной внутриклеточной сигнальной молекулы, вовлеченной в регуляцию подвижности, адгезии, вирулентности, образования биопленки и других сложных физиологических процессов [2]. Описаны также адьювантные [6] и интерферогенные свойства этого соединения [7, 8]. Таким образом, цикло-ди-АМФ можно рассматривать в качестве потенциального вакцинного адьюванта и противовирусного лекарственного препарата.

Основным методом получения цикло-ди-АМФ долгое время являлся многостадийный и экологически небезопасный химический синтез [9–11]. Более перспективным способом получения цикло-ди-АМФ следует считать синтез с использованием бактериальной ДАЦ, позволяющий получать его в одну стадию из АТФ без применения дорогостоящих и токсичных реагентов [12].

В литературе описаны три штамма – продуцента ДАЦ, представляющие собой клетки *Escherichia coli* BL21(DE3), трансформированные плазмидами pGP1973, pGP1974 и pGP1975, несущими клонированные гены трех различных изоформ (DisA, CdaA и CdaS) ДАЦ *B. subtilis* [13].

Данные по активности штаммов в отношении рекомбинантной ДАЦ (в единицах активности на 1 мл культуральной жидкости (КЖ), 1 мг белка или биомассы клеток) в работе не приведены.

В 2015 г. в Китае выдан патент [14] на рекомбинантную плазмиду рЕХ-МВР, несущую ген *DisA*, кодирующий ДАЦ. При трансформации этой плазмидой штамма-реципиента *E. coli* BL21(DE3) получают штамм, способный продуцировать ДАЦ в количестве 538 мг/л КЖ.

Цель данного исследования – создание отечественного штамма – продуцента ДАЦ и изучение возможности использования этого фермента для получения цикло-ди-АМФ в препаративных количествах.

Объекты и методы исследования. Источником структурного гена *btDisA* (GeneID: 558577181), кодирующего ДАЦ, служила хромосомная ДНК штамма бактерий *B. thuringiensis* ВТ407 (Novagen, США). Для выделения гена *btDisA* использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и олигонуклеотидные праймеры: *btDisA_F* (5'-GTGGTGGTCCACAACATGGAAGAAAATAAGCAACG-3') и *btDisA_R* (5'-GGTGATGGTGGTATGCTCATTGTGTCTACTCATATAGAGATGC-3'). На 5'-окончания праймеров встроены нуклеотидные последовательности (подчеркнуты), комплементарные плазмиде рЕТ42a+ (Novagen, США).

Линеаризацию вектора рЕТ42a+ проводили методом ПЦР с использованием праймеров рЕТ42lin-R (5'-GAGCATCACCATCACCAACCACCACTAATTG-3') и рЕТ42lin-F (5'-CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAATAATTATTTCTAGAG-3'). Сборку полученных фрагментов (линеаризованного вектора и гена, кодирующего ДАЦ) осуществляли методом продолжительной перекрывающейся ПЦР (ПП-ПЦР) [15]. Продукты ПП-ПЦР использовали для трансформации клеток *E. coli* BL(DE3) (Novagen, США), в результате чего был получен рекомбинантный штамм *E. coli* рВtdac – продуцент ДАЦ *B. thuringiensis*.

Клетки-трансформанты культивировали 12–14 ч при 37 °С на биологической качалке в питательной среде, содержащей 1,0 %-ный триптон, 0,5 %-ный дрожжевой экстракт, 0,5 %-ный глицерин, 0,05 %-ную глюкозу, 0,2 %-ную α-D-лактозу, 0,025 М Na₂HPO₄, 0,025 М KH₂PO₄, 0,05 М NH₄Cl, 0,005 М Na₂SO₄, 50 мкг/мл канамицина (рН 7,0). По окончании выращивания клетки осаждали путем центрифугирования, ресуспендировали в 50 мМ Трис-НСl-буфере (рН 8,0), содержащем 0,1 М NaCl, и разрушали ультразвуком в приборе Sonifier-450 (Branson, США). Клеточный лизат осветляли путем центрифугирования при 21 000 г в течение 15 мин. Очистку целевого белка проводили с помощью металло-аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе (Qiagen, США) согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. Очищенный фермент подвергали диализу против 1000-кратного объема 50 мМ Трис-НСl-буфера (рН 7,5), содержащего 50 мМ KCl.

Анализ белкового состава клеточного лизата, а также очищенного фермента проводили с помощью ДСН-полиакриламидного гель-электрофореза. Молекулярные массы белков, а также уровень экспрессии клонированных генов определяли с помощью программы ImageLab (BioRad, США).

Определение активности ДАЦ проводили в 100 мкл реакционной смеси, содержащей (мМ): хлорид магния – 10,0, Трис-НСl (рН 8,0) – 100,0, АТФ – 5,0 и 10 мкл ферментного препарата. Реакционную смесь инкубировали при 50 °С. Ход реакции контролировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Аналитическую обращенно-фазную ВЭЖХ проводили с помощью прибора LC-30 Nexera (Shimadzu, Япония) с использованием колонки Jupiter C18 300 Å (Phenomenex, США). Соединения элюировали линейным градиентом ацетонитрила (0–10 %) в 50 мМ триэтиламин-ацетатном буфере (рН 6,5) за 8 мин при скорости 0,3 мл/мин.

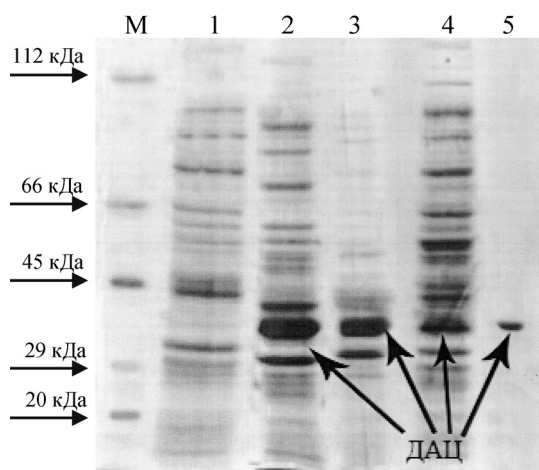


Рис. 1. Электрофореграмма (денатурирующие условия) внутриклеточных белков *E. coli* рВtdac. М – положение и молекулярные массы стандартных белков. Белковый состав: 1 – клеток до индукции синтеза ДАЦ; 2 – клеток после индукции; 3 – нерастворимой фракции клеток; 4 – растворимой фракции клеток; 5 – очищенная ДАЦ

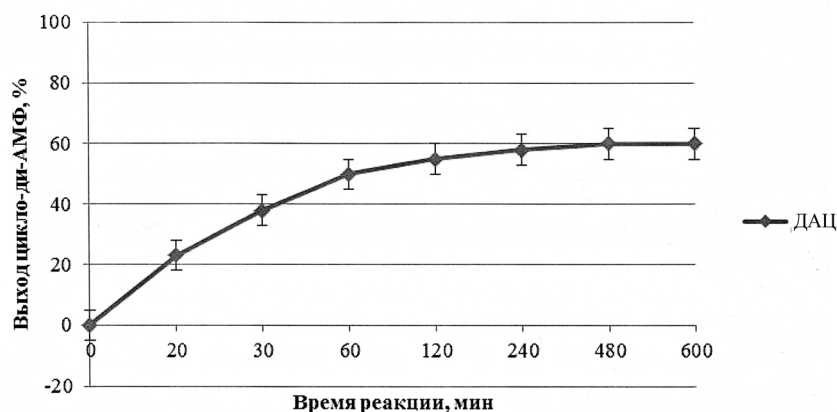


Рис. 2. Синтез цикло-ди-АМФ с помощью рекомбинантной ДАЦ

За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое обеспечивало образование цикло-ди-АМФ в количестве 1 мкмоль за 1 мин.

Препаративный синтез циклического динуклеотида проводили в реакционной смеси (1 л), аналогичной по составу используемой для определения активности ДАЦ, но содержащей 0,52 мг очищенного фермента. Смесь инкубировали при 50 °С. Протекание реакции синтеза целевого соединения контролировали с помощью ВЭЖХ. После окончания реакции синтеза реакционную смесь прогревали (5 мин) на кипящей водяной бане и центрифугировали для удаления денатурированного фермента.

Частично очищенную реакционную смесь наносили на колонку со смолой DEAE-Toyopearl 650M (Тоyo soda, Япония). Элюцию целевого соединения со смолы осуществляли линейным градиентом (от 0,05 до 0,5 М) раствора NaCl, содержащего 0,01 М HCl. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и лиофилизировали.

Анализ чистоты полученного соединения проводили с помощью масс-спектрометра Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS System (Agilent, США).

Результаты и их обсуждение. На первом этапе работы с помощью методов генетической инженерии сконструирован штамм *E. coli* pBtdac – продуцент ДАЦ *B. thuringiensis*. Клетки выращивали в жидкой питательной среде, индукцию синтеза белка проводили методом аутоиндукции [16]. Анализ белкового состава клеточного лизата, а также растворимой и нерастворимой фракций белков, проведенный с помощью ДСН-полиакриламидного гель-электрофореза (рис. 1), показал, что основная часть ДАЦ находится в нерастворимой фракции лизата клеток. Это означает, что она продуцируется в форме телец включения.

На втором этапе проводили аффинно-хроматографическую очистку ДАЦ и анализ активности полученного ферментного препарата. Для анализа активности ДАЦ использовали только растворимую фракцию клеточного лизата. Продуцирующая способность полученного штамма в отношении целевого фермента, содержащегося вне телец включения, составила 32 мг/л КЖ. При этом уровень экспрессии рекомбинантного фермента составил 21 % от общего белка клетки.

Результаты эксперимента по синтезу цикло-ди-АМФ под действием полученного очищенного фермента представлены на рис. 2. Из рисунка видно, что кривая, отражающая накопление продукта с течением времени, выходит на плато через 5 ч протекания реакции, достигая 60 %-ного выхода.

При изучении термостабильности ДАЦ выявлено, что фермент в растворе без субстрата не выдерживает прогревания при 50 °С в течение даже 1 ч. Таким образом, полученный фермент не обладает высокой термостабильностью и требует при проведении синтезов незамедлительного внесения субстрата.

Субстратная специфичность ДАЦ

Субстрат	Выход цикло-ди-АМФ, мол. %	Время реакции, ч
АТФ	60	5
УТФ	< 0,1	24
дЦТФ	< 0,1	24
дТТФ	< 0,1	24
дАТФ	< 0,1	24
дГТФ	< 0,1	24
ЦТФ	< 0,1	24
АДФ	< 0,1	24
p4A	< 0,1	24

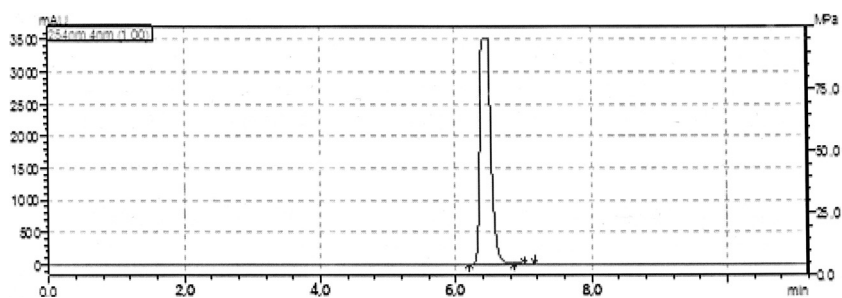


Рис. 3. Хроматограмма очищенного цикло-ди-АМФ

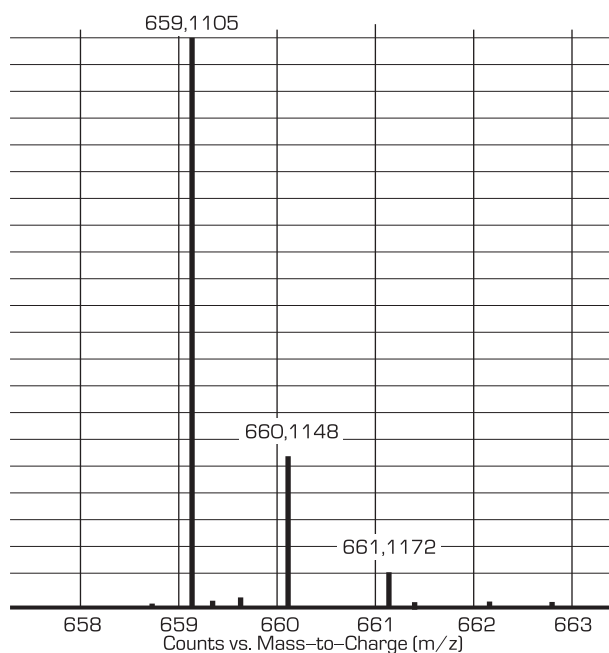


Рис. 4. Масс-спектр препарата очищенного цикло-ди-АМФ

смоле DEAE-Тоурpearl 650M. Выбор этой смолы обусловлен тем, что по сравнению с другими проверенными смолами (Dowex 1x8 фирмы Serva, Macro-Prep DEAE Support фирмы Bio-Rad) она характеризуется более качественным отделением целевого продукта от исходных веществ.

На конечном этапе работы проводили анализ полученного соединения методом масс-спектрометрии (рис. 4), который показал, что его масса соответствует массе цикло-ди-АМФ, рассчитанной теоретически.

В качестве обсуждения результатов работы следует отметить, что до настоящего времени максимально препаративный (100 мг) ферментативный синтез цикло-ди-АМФ был описан в работе [17]. Нам удалось превзойти этот результат в 6 раз.

Заключение. Сконструирован новый рекомбинантный штамм *Escherichia coli* pBtdac, продуцирующий диаденилатциклазу *Bacillus thuringiensis*. Количество диаденилатциклазы, продуцируемой рекомбинантным штаммом, составляет 32 мг в 1 л культуральной жидкости. Изучена субстратная специфичность и стабильность полученного фермента. Продемонстрировано применение очищенной диаденилатциклазы для препаративного (600 мг) синтеза цикло-ди-АМФ.

Список использованной литературы

1. Romling, U. Great times for small molecules: c-di-AMP, a second messenger candidate in bacteria and archaea / U. Romling // *Sci. Signal.* – 2008. – Vol. 1.: e39.
2. Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates / G. Witte [et al.] // *Mol. Cell.* – 2008. – Vol. 30. – P. 167–178.
3. Woodward, J. J. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response / J. J. Woodward, A. T. Iavarone, D. A. Portnoy // *Science.* – 2010. – Vol. 328. – P. 1703–1705.

4. c-di-AMP is a new second messenger in *Staphylococcus aureus* with a role in controlling cell size and envelope stress / R. M. Corrigan [et al.] // PLoS Pathol. – 2011. – Vol. 7.: e1002217.
5. Identification of a *Streptococcus pyogenes* SF370 gene involved in production of c-di-AMP / T. Kamegaya [et al.] // Med. Sci. – 2011. – Vol. 73. – P. 49–57.
6. Bis-(3',5')-cyclic dimeric adenosine monophosphate: Strong Th1/Th2/Th17 promoting mucosal adjuvant / T. Ebensen [et al.] // Vaccine. – 2011. – Vol. 29. – P. 5210–5220.
7. The *N*-ethyl-*N*-nitrosourea-induced *Goldenticket* mouse mutant reveals an essential function of *Sting* in the *in vivo* interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides / J. D. Sauer [et al.] // Infect. Immunol. – 2011. – Vol. 79. – P. 688–694.
8. A bacterial cyclic dinucleotide activates the cytosolic surveillance pathway and mediates innate resistance to tuberculosis / B. Dey [et al.] // Nat. Med. – 2015. – Vol. 21. – P. 401–406.
9. Hsu, C.-Y. J. Synthesis and physical characterization of Bis 3',5' cyclic dinucleotides (–NpNp–): RNA polymerase inhibitors / C.-Y. J. Hsu, D. Dennis, R. A. Jones // Nucleosides, Nucleotides. –1985. – Vol. 4, N 3. – P. 377–389.
10. The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. Chemical synthesis and biological activity of cyclic nucleotide dimer, trimer, and phosphothioate derivatives / P. Ross [et al.] // J. Biol. Chem. – 1990. – Vol. 265. – P. 18933–18943.
11. Suzuki, N. Practical synthesis of cyclic bis (3'–5') diadenylic acid (c-di-AMP) / N. Suzuki, K. Oyama, M. Tsukamoto // Chem. Lett. – 2011. – Vol. 40. – P. 1113–1114.
12. *Mycobacterium tuberculosis* Rv3586 (DacA) is a diadenylate cyclase that converts ATP or ADP into c-di-AMP / Y. Bai [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, N 4.: e35206.
13. Cyclic di-AMP homeostasis in *Bacillus subtilis* both lack and high level accumulation of the nucleotide are detrimental for cell growth / F. M. Mehne [et al.] // J. Biol. Chem. – 2013. – Vol. 288, N 3. – P. 2004–2017.
14. pEX-MBP recombinant plasmid for DisA expression: пат. 104293822 Китай / G. Yang, Z. Guo, J. Wang [et al.]; дата публ. 21.01.2015.
15. Quan, J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways / J. Quan, J. Tian // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4, N 7.: e6441.
16. Studier, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures / F. W. Studier // Protein Expr. Purif. – 2005. – Vol. 41, N 1. – P. 207–234.
17. Highly efficient enzymatic preparation of c-di-AMP using the diadenylate cyclase DisA from *Bacillus thuringiensis* / C. Zheng [et al.] // Enzyme Microbiol. Technol. – 2013. – Vol. 52, N 6–7. – P. 319–324.

Поступила в редакцию 28.08.2015