

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 579.66:577.15+577.113.3

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-2-239-244>

Поступила в редакцию 12.11.2019

Received 12.11.2019

**А. Б. Булатовский, А. И. Зинченко**

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

## **СОЗДАНИЕ ШТАММА – ПРОДУЦЕНТА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗЫ, СЛИТОЙ С ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ АННЕКСИНОМ А5**

**Аннотация.** Бактериальная пуриинуклеозидфосфорилаза (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 химерный белок, молекула которого состоит из гомологичной ПНФазы, слитой с человеческим аннексином А5 – белком, проявляющим сродство к раковым клеткам. Продуцирующая способность штамма – продуцента химерного белка «Аннексин-ПНФаза» в отношении ПНФазы, рассчитанная по результатам реакции фосфоролитического расщепления инозина, составила 10 200 ед/мл культуральной жидкости. Полученный штамм предназначен для создания технологии получения новых противоопухолевых препаратов.

**Ключевые слова:** рекомбинантный штамм, химерный белок, человеческий аннексин А5, пуриинуклеозидфосфорилаза, *Escherichia coli*

**Для цитирования:** Булатовский, А. Б. Создание штамма – продуцента бактериальной пуриинуклеозидфосфорилазы, слитой с человеческим аннексином А5 / А. Б. Булатовский, А. И. Зинченко // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. навук. – 2020. – Т. 65, № 2. – С. 239–244. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-2-239-244>

**Aleksei B. Bulatovski, Anatoliy I. Zinchenko**

*Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

## **CREATION OF STRAIN – PRODUCER OF BACTERIAL PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE FUSED WITH HUMAN ANNEXIN A5**

**Abstract.** It is known that bacterial purine nucleoside 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 bacterial PNPase (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 is known to protect cancer cells from antitumor immunity.

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

The production capacity of the producer strain of the chimeric protein “Annexin-PNPase” with respect to PNPase calculated from the results of the inosine phosphorolysis reaction, was 10,200 units/ml of culture liquid. The obtained strain is intended for creation of a technology for obtaining new antitumor preparations.

**Keywords:** recombinant strain, fusion protein, human annexin A5, purine nucleoside phosphorylase, *Escherichia coli*

**For citation:** Bulatovski A. B., Zinchenko A. I. Creation of strain – producer of bacterial purine nucleoside phosphorylase fused with human annexin A5. *Vesti Natsyyanal'noi akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 2, pp. 239–244 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-2-239-244>

**Введение.** Известно, что пуриинуклеозидфосфорилаза (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, 3]. Этот терапевтический подход предусматривает введение гена, кодирующего ПНФазу *Escherichia coli* (*E. coli*), в клетки опухоли с последующим превращением с помощью этого фермента, например слаботоксичного арабинофуранозил-2-фтораденина (пролекарство), в губительную для клеток субстанцию – 2-фтораденин [4].

Нами ранее [5] 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.

J. Kraiss с соавт. [3] предложили доставлять бактериальную ПНФазу в опухоли в форме ее химического конъюгата с аннексином А5 – человеческим белком, проявляющим сродство к фосфатидилсерину – липиду, выстилающему поверхность опухолевых клеток [6, 7]. Для реализации этого предложения авторами был создан относительно слабоактивный рекомбинантный штамм бактерий, продуцирующих ПНФазу *E. coli*, слитую с аннексином А5, 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 *Escherichia coli*, продуцирующего гомологичную ПНФазу, слитую с человеческим аннексином А5.

**Материалы и методы исследования.** Источником структурного гена *anxA5*, кодирующего аминокислотную последовательность человеческого аннексина-А5 (далее – аннексина), служила плаزمида рЕТ12-РАР1 (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 [8]. Для дальнейшего выделения генов использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и специально подобранные олигонуклеотидные праймеры (см. таблицу).

**Последовательности олигонуклеотидных праймеров**  
**Sequences of oligonucleotide primers**

Праймер	Назначение праймера
<b>deoD-F</b> (5'-GTGGTGGTCCACAACGCTACCCCA-ACATTAATG-3')	Прямой праймер для амплификации гена <i>deoD</i>
<b>deoD-R</b> (5'-GATCCAGAACCGAGCCCTCTTTATC-GCCCAGCAG-3')	Обратный праймер для амплификации гена <i>deoD</i> , содержит линкерный участок
<b>anxA5-F</b> (5'-GGCTCCGGTTCTGATCCACAGGT-TCTCAGAGGCA-3')	Прямой праймер для амплификации гена <i>anxA5</i> , содержит линкерный участок
<b>anxA5-R</b> (5'-GGTGATGGTGATGCTCGTCATCTT-TCCACAGAGCAG-3')	Обратный праймер для амплификации гена <i>anxA5</i>

Примечание. Подчеркиванием отмечены линкерные участки.

Полученные гены *anxA5* и *deoD* и плазмиды рЕТ42a(+) (Novagen, США) были собраны в одну генетическую конструкцию (обозначенную как рЕТ42a-PNP-AnxA5) методом продолжительной перекрывающейся ПЦР [9].

Для предотвращения стерических препятствий, затрудняющих функционирование слитых белков, между их генами в плазмиду 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 (фирма 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 °С до оптической плотности 0,5 при  $\lambda = 600$  нм, после чего индуцировали синтез химерного белка путем внесения в среду изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) в конечной концентрации 0,2 мМ.

Активность ПНФазы химерного белка определяли по скорости фосфорилиза инозина [3], процентное содержание целевого белка в клетках – с использованием программы ImageLab (BioRad, США). За единицу активности ПНФазы принимали такое ее количество, которое обеспечивало фосфорилиз нуклеозида при 37 °С со скоростью 1 мкмоль/мин.

Белковый состав клеточного лизата, а также очищенного химерного белка определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия (ДСН), молекулярные массы белков, а также уровень экспрессии клонированных генов – с помощью программы ImageLab (BioRad, США). Содержание белка в образцах определяли методом М. Bradford [10]. Приведенные в работе экспериментальные данные представляют собой доверительный интервал среднего арифметического для 95 %-ного уровня вероятности.

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

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 спустя 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 путем центрифугирования 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). По результатам электрофореза чистота препарата в ДСН-полиакриламидном геле (рис. 1) составила около 98 %.

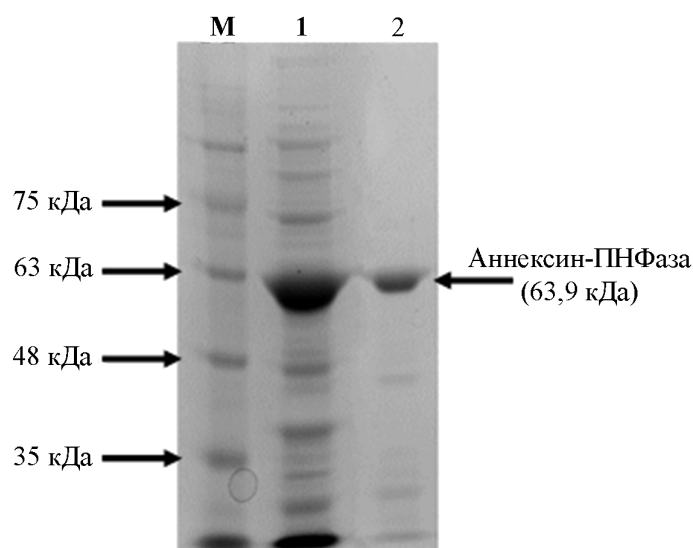


Рис. 1. Электрофореграмма в ДСН-полиакриламидном геле химерного белка до (1) и после (2) выделения из лизата клеток *E. coli* AD19. М – маркерные белки с известной молекулярной массой

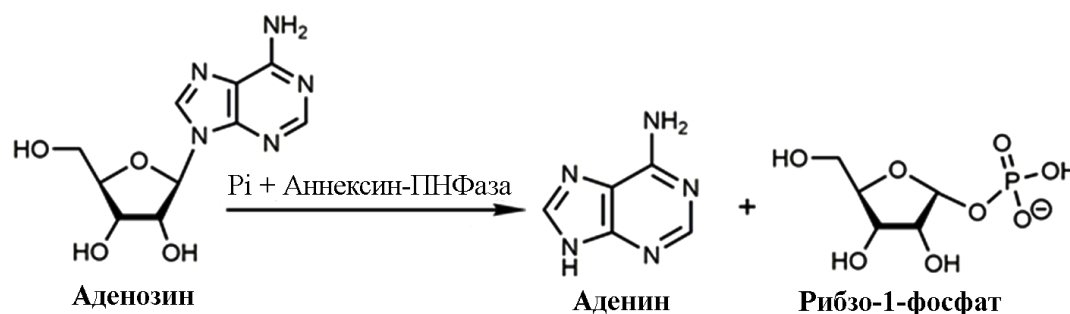
Fig. 1. SDS-PAGE image of fusion protein before (1) and after (2) isolation from *E. coli* AD19 cell lysate. М – protein molecular weight markers

Продуцирующая способность штамма *E. coli* AD19 в отношении активности ПНФазы в составе химерного белка составила 10 200 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 [11]. В связи с этим ранее нами была выдвинута идея об устранении защиты рака от противоопухолевого иммунитета с помощью аденозиндезаминазы, слитой с аннексином А5 [12].

Поскольку бактериальная ПНФаза (так же 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:



Динамика разложения аденозина под действием ПНФазы химерного белка «Аннексин-ПНФаза» представлена на рис. 2. Продуцирующая способность штамма – продуцента этого белка в отношении ПНФазы, рассчитанная по результатам такого эксперимента, составила  $9800 \pm 200$  ед/мл культуральной жидкости.

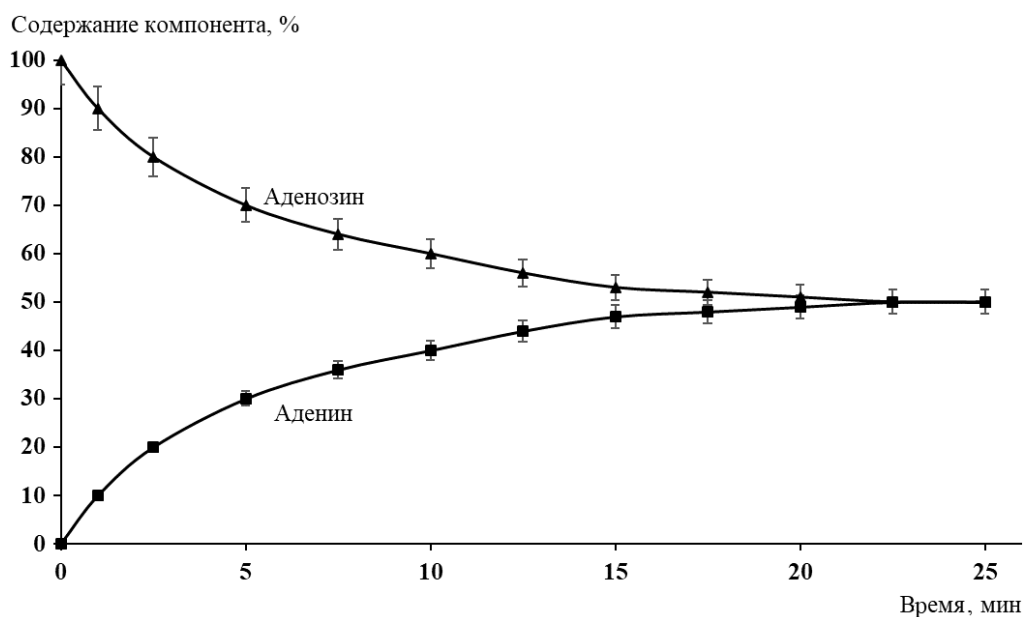


Рис. 2. Динамика убывания аденозина и накопления аденина в реакционной смеси

Fig. 2. Dynamics of adenosine decreasing and adenine accumulation in reaction mixture

**Заклучение.** 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 10 200 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.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках задания 3.32 Государственной программы научных исследований «Микробные биотехнологии», 2016–2020 гг.

**Acknowledgements.** The work was supported by the grant 3.32 from the Belarus State Research Program “Microbial Biotechnologies”, 2016–2020.

### Список использованных источников

1. Expression, purification, and characterization of recombinant purine nucleoside phosphorylase from *Escherichia coli* / J. Lee [et al.] // *Protein Expr. Purif.* – 2001. – Vol. 22, N 2. – P. 180–188. <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1437>
2. Portsmouth, D. Suicide genes for cancer therapy / D. Portsmouth, J. Hlavaty, M. Renner // *Mol. Aspects Med.* – 2007. – Vol. 28, N 1. – P. 4–41. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2006.12.001>
3. 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, N 10. – P. e76403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076403>
4. *In vivo* gene therapy of cancer with *E. coli* purine nucleoside phosphorylase / W. B. Parker [et al.] // *Hum. Gene Ther.* – 1997. – Vol. 8, N 14. – P. 1637–1644. <https://doi.org/10.1089/hum.1997.8.14-1637>
5. Синтез флударабин-5'-монофосфата с использованием бактериальных рекомбинантных ферментов / А. И. Береснев [и др.] // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2017. – Т. 62, № 1. – С. 7–15.
6. In search of a novel target – phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy / S. Riedl [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta. Biomembranes.* – 2011. – Vol. 1808, N 11. – P. 2638–2645. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.026>
7. Sharma, B. Phosphatidylserine: a cancer cell targeting biomarker / B. Sharma, S. S. Kanwar // *Semin. Cancer Biol.* – 2018. – Vol. 52, Pt. 1. – P. 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.08.012>
8. Sambrook, J. F. *Molecular cloning: a laboratory manual* / J. F. Sambrook, D. W. Russell. – 3rd ed. – New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – 2100 p.
9. Quan, J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways / J. Quan, J. Tian // *PLoS ONE.* – 2009. – Vol. 4, N 7. – P. e6441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441>
10. Walker, J. M. *The protein protocol handbook* / J. M. Walker. – 2nd ed. – Totowa : Humana Press, 2002. – 15 p.
11. Vaupel, P. Hypoxia-driven adenosine accumulation: a crucial microenvironmental factor promoting tumor progression / P. Vaupel, A. Mayer // *Advances in Experimental Medicine and Biology* / ed. : C. E. Elwell, T. S. Leung, D. K. Harrison. – New York, 2016. – Vol. 876 : Oxygen Transport to Tissue. – P. 177–183.
12. Зинченко, А. И. Аденозин как потенциальная мишень для биотерапии рака / А. И. Зинченко // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2016. – Т. 61, № 4. – С. 118–128.

### References

1. Lee J., Filosa S., Bonvin J., Guyon S., Aponte R. A., Turnbull J. L. Expression, purification, and characterization of recombinant purine nucleoside phosphorylase from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2001, vol. 22, no. 2, pp. 180–188. <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1437>
2. Portsmouth D., Hlavaty J., Renner M. Suicide genes for cancer therapy. *Molecular Aspects of Medicine*, 2007, vol. 28, no. 1, pp. 4–41. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2006.12.001>
3. Kraiss J. J., De Crescenzo O., Harrison R. G. Purine nucleoside phosphorylase targeted by Annexin V to breast cancer vasculature for enzyme prodrug therapy. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 10, p. e76403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076403>
4. Parker W. B., King S. A., Allan P. W., Bennett L. L. Jr, Secrist J. A. 3rd, Montgomery J. A. [et al.]. *In vivo* gene therapy of cancer with *E. coli* purine nucleoside phosphorylase. *Human Gene Therapy*, 1997, vol. 8, no. 14, pp. 1637–1644. <https://doi.org/10.1089/hum.1997.8.14-1637>
5. Beresnev A. I., Rymko A. N., Eroshevskaia L. A., Kvach S. V., Kvasiuk E. I., Zinchenko A. I. Synthesis of fludarabine 5'-monophosphate using bacterial recombinant enzymes. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biyalyagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, vol. 62, no. 1, pp. 7–15 (in Russian).
6. Riedl S. I., Rinner B., Asslaber M., Schaidler H., Walzer S., Novak A., Lohner K., Zweytick D. In search of a novel target – phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2011, vol. 1808, no. 11, pp. 2638–2645. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.026>

7. Sharma B., Kanwar S. S. Phosphatidylserine: a cancer cell targeting biomarker. *Seminars in Cancer Biology*, 2017, vol. 52, pt. 1, pp. 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.08.012>
8. Sambrook J. F., Russell D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press Publ., 2001. 2100 p.
9. Quan J., Tian J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PLoS ONE*, 2009, vol. 4, no. 7, p. e6441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441>
10. Walker J. M. *The protein protocol handbook*. 2nd ed. Totowa, Humana Press Publ., 2002. 15 p.
11. Vaupel P., Mayer A. Hypoxia-driven adenosine accumulation: a crucial microenvironmental factor promoting tumor progression. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 876. *Oxygen Transport to Tissue*. New York, 2016, pp. 177–183. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3023-4\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3023-4_22)
12. Zinchenko A. I. Adenosine as a potential target for cancer biotherapy. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2016, vol. 61, no. 4, pp. 118–128 (in Russian).

### Информация об авторах

Булатовский Алексей Борисович – мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купевича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: a.bulatovski@yandex.ru

Зинченко Анатолий Иванович – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купевича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by

### Information about the authors

Aleksei B. Bulatovski – Junior researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a.bulatovski@yandex.ru

Anatoliy I. Zinchenko – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by