

**Kazlouski I.S.**

Master of Biol. Sci., researcher,  
Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences

**Belskaya I.V.**

Master of Biol. Sci., junior researcher,  
The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology

**Bulatovskiy A.B.**

Master of Biol. Sci., junior researcher,  
Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences

**Zinchenko A.I.**

Sc.D., professor, head of laboratory,  
Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences

## ESCHERICHIA COLI-BASED CELL-FREE SYNTHESIS OF THERMOTOGA MARITIME DIGUANYLATE CYCLASE AND TWO CHIMERIC PROTEINS

**Казловский И.С.**

магистр биологических наук, научный сотрудник,  
Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси

**Бельская И.В.**

магистр биологических наук, младший научный сотрудник,  
Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии

**Булатовский А.Б.**

магистр биологических наук, младший научный сотрудник,  
Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси

**Зинченко А.И.**

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией,  
Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси

## СИНТЕЗ ДИГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ THERMOTOGA MARITIME И ДВУХ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ, ИСПОЛЬЗУЯ СИСТЕМУ БЕСКЛЕТОЧНОГО СИНТЕЗА БЕЛКА

**Summary.** One of the novel promising trends of molecular biotechnology is cell-free synthesis of proteins. The procedure is based on reconstruction *in vitro* of all stages of protein biosynthesis in a whole cell, including transcription, aminoacylation of tRNA and translation of mRNA by ribosomes. Feasibility of producing diguanylate cyclase (DGC) of *Thermotoga maritime* and two chimeric proteins: human annexin-A5 fused with adenosine deaminase (A5-ADase) of *Escherichia coli*, and modified *Taq* DNA polymerase fused with DNA-affine domain of bacteria *Sulfolobus solfataricus* (Diamond-DNA polymerase), by cell-free biosynthesis procedure as an alternative to classical submerged fermentation method was evaluated in the present investigation. Chimeric RNA polymerase of T7 bacteriophage, S30-cell extract of *Escherichia coli* and multicopy plasmid vector pET42mut were engaged for protein synthesis. The completed research resulted in the first successful biosynthesis of these proteins in cell-free system. Under partially optimized process conditions, 1 ml experimental samples of DGC, A5-ADase and Diamond-DNA polymerase with enzyme activities 45 U/ml, 5 U/ml and 250 U/ml, respectively, were produced.

**Аннотация.** Одним из новых перспективных направлений молекулярной биотехнологии является бесклеточный синтез белка (БСБ). Процедура БСБ основана на реконструкции *in vitro* всех этапов биосинтеза белка в клетке, включая транскрипцию, аминокислотирование тРНК и трансляцию мРНК рибосомами. В настоящем исследовании в качестве варианта, альтернативного каноническому глубинному культивированию в ферментере, была изучена возможность синтеза в бактериальной системе БСБ дигуанилатциклазы (ДГЦ) бактерии *Thermotoga maritime* и двух химерных белков: человеческого аннексина-А5, слитого с аденозиндеаминазой *Escherichia coli* (А5-АДаза), и модифицированной *Taq*-ДНК-полимеразы, слитой с ДНК-аффинным доменом бактерии *Sulfolobus solfataricus* (Диамант-ДНК-полимераза). Для синтеза этих белков использовали S30-клеточный экстракт *E. coli*, химерную РНК-полимеразу бактериофага Т7 и высококопийный плазмидный вектор pET42mut. В результате выполнения работы нами впервые продемонстрирована возможность синтеза данных белков в системе БСБ. При этом в частично оптимизированных условиях проведения процесса получено по 1 мл экспериментальных образцов ДГЦ, А5-АДазы и Диамант-ДНК-полимеразы с активностью 45 Ед/мл, 5 Ед/мл и 250 Ед/мл ферментного препарата, соответственно.

**Key words:** chimeric protein, diguanylate cyclase, annexin-A5, adenosine deaminase, Diamond-DNA polymerase, *Escherichia coli*, cell-free protein synthesis system, multicopy plasmid

Ключевые слова: химерный белок, дигуанилатциклаза, аннексин-А5, аденозиндезаминаза, Диамант-ДНК-полимераза, *Escherichia coli*, бесклеточный синтез белка, высококопийная плазмида

### Введение.

В настоящее время для получения лекарственных препаратов пептидной или белковой природы (интерферонов, антигенов, антител, гормонов) широко применяется биотехнология на основе генетической инженерии (выделение и клонирование генов, получение кДНК, введение генов в чужеродные про- или эукариотические клетки, экспрессия гетерологичных белков). Несмотря на значительные достижения, этот подход имеет существенные ограничения: 1) не все гены экспрессируются в «чужом молекулярном окружении» из-за несоответствия элементов регуляции реципиентных клеток и донорских генов; 2) пока не удалось достичь экспрессии полицистронных мРНК; 3) не происходит посттрансляционная модификация и формирование нативной структуры протеинов высших эукариот в бактериальных клетках.

В качестве альтернативы канонической генно-инженерной технологии получения хозяйственно важных белков ряд исследовательских групп начали использовать для протеинового синтеза бесклеточные системы [1–3].

Реакционная смесь для бесклеточного синтеза белка (БСБ) – открытая система без физических барьеров, таких как клеточная мембрана. Выход конечного продукта зависит от концентрации каждого компонента, которую можно варьировать в широких пределах, в отличие от ситуации *in vivo*, то есть варианта с использованием целых клеток. При этом конечная концентрация белка достигает более 2 мг/мл реакционной смеси [4].

Система БСБ предусматривает транскрипцию гена и трансляцию мРНК *in vitro* – в лизате клеток, в который вносят рекомбинантную ДНК, аминокислоты, нуклеотиды, кофакторы и АТФ-регенерирующую систему. Эндогенная генетическая информация (ДНК и мРНК клетки-хозяина) при этом удаляется.

По сравнению с системами, основанными на целых клетках, системы БСБ обладают рядом преимуществ. Среди них можно выделить:

- продукцию исключительно целевого белка, что кардинально облегчает процедуру его выделения и очистки;
- возможность синтеза токсичных для клеток белков;
- возможность синтеза белков, которые содержат неприродные аминокислоты;
- возможность решать проблему агрегации целевого белка путем ввода в реакционную смесь агентов, позволяющих удерживать синтезирующийся полипептид в растворе.

В настоящее время БСБ стал экономичной и легко масштабируемой технологией для получения препаративных количеств различных белковых продуктов.

Аннексин-А5 представляет собой белок с повышенным сродством к фосфатидилсерину – фосфолипиду, выстилающему поверхность раковых клеток. Поскольку на поверхности большинства здоровых клеток фосфатидилсерин отсутствует, его широко используют в качестве мишени для избирательной доставки в опухоли визуализирующих красителей [5]. Таким образом, аннексин-А5 – привлекательный белок для использования в качестве селективного транспортера в опухоль тех или иных лекарственных соединений. Есть основания полагать, что химерный белок, состоящий из аннексина-А5 и аденозиндезаминазы (А5-Адазы), будет за счет аннексина-А5 связываться с раковыми клетками и устранять аденозин, защищая раковые клетки от противоопухолевого иммунитета хозяина [6].

Циклический дигуанозинмонофосфат (цикло-диГМФ), согласно литературным данным, продуцируется только бактериями и обладает выраженными стимулирующими свойствами в отношении иммунной системы позвоночных. В настоящее время цикло-диГМФ получают, главным образом, с помощью трудоемкого химического синтеза. В то же время ферментативный синтез с использованием дигуанилатциклазы *Thermotoga maritima* (ДГЦ) представляет собой одностадийный процесс конденсации двух молекул гуанозин-5'-трифосфата [7].

Диамант-ДНК-полимераза представляет собой химерную ДНК-полимеразу с улучшенными свойствами за счет присоединения к *Taq*-ДНК-полимеразе ДНК-связывающего домена (SSO7D) бактерии *Sulfolobus solfataricus* [8].

Целью настоящей работы служило получение в системе БСБ рекомбинантных ДГЦ, А5-Адазы и Диамант-ДНК-полимеразы, синтез которых традиционным способом, предусматривающим использование целых бактериальных клеток, затруднен.

**Материалы и методы исследования.** Источником генов ДГЦ (*TM1788*), А5-Адазы (*anxA5-add*) и Диамант-ДНК-полимеразы (*SSO\_RS12375-taq*) служили ДНК *T. maritima*, низкокопийные плазмиды pET42-A5-add [9] и pET18b-STaq [8], соответственно. Целевые фрагменты ДНК амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием синтетических праймеров. Подбор праймеров проводили с использованием программного обеспечения UGENE 1.22 (UniPro, Россия) на основе нуклеотидных последовательностей целевых генов. На 5'-окончания праймеров были добавлены последовательности, комплементарные плазмиде pET42mut [10]. Амплификацию осуществляли по следующей программе: этап предденатурации (30 с

при 98 °С) – 30 циклов амплификации (10 с при 98 °С; 15 с при 55 °С; 1 мин при 72 °С) – финальная элонгация 75 с при 72 °С. На втором этапе линеаризовали плазмиду pET42mut методом, описанным ранее [10].

На следующем этапе собирали линеаризованный вектор и целевые гены методом продолжительной перекрывающейся ПЦР (ПП-ПЦР) по следующей программе: этап предденатурации (30 с при 98 °С) – 16 циклов амплификации (10 с при 98 °С; 15 с при 50 °С; 4 мин при 72 °С) – финальная элонгация 5 мин при 72 °С. На этом этапе в качестве матрицы и затравки были использованы фрагменты, полученные на первых двух этапах, в эквимоллярных количествах.

Синтезированным в ходе ПП-ПЦР продуктом трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL (Novagen, США) с последующим посевом на плотную селективную питательную среду с добавлением канамицина (100 мкг/мл).

Для определения наличия плазмид, содержащих целевые «вставки ДНК», использовали стандартный метод ПЦР-скрининга.

Клетки, содержащие целевые плазмиды, культивировали в жидкой среде LB с последующим

выделением плазмидной ДНК методом щелочного лизиса.

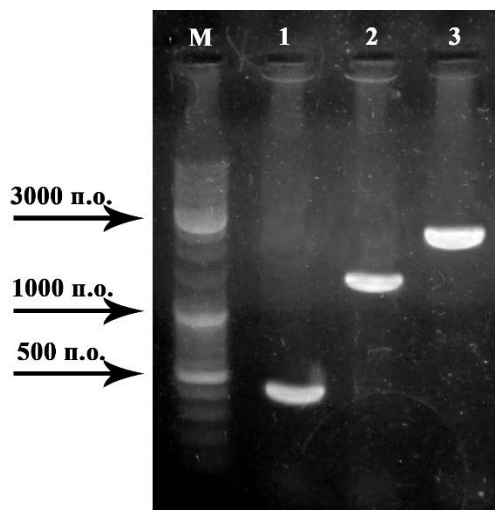
Для синтеза белков использовали следующую реакционную смесь (1.0 мл): 0.25 мл клеточного экстракта S30, 0.65 мл премикса, 5 000 ед. активности РНК-полимеразы бактериофага T7, 500 нг плазмидной ДНК, полученные на предыдущем этапе работы, и инкубировали при 30 °С в течение 5–6 ч.

Активность ДГЦ, А5-АДазы и Диамант-ДНК-полимеразы определяли согласно методов, описанных в работах [11], [9] и [8].

#### Результаты и обсуждение.

Первый этап работы включал в себя амплификацию генов *TM1788*, *anxA5-add* и *SSO\_RS12375-taq*, кодирующих аминокислотные последовательности ДГЦ *T. maritime* и последовательности химерных белков А5-АДазы и Диамант-ДНК-полимеразы, соответственно.

Постановка горизонтального ДНК-электрофореза в агарозном геле после выделения и амплификации генов позволила убедиться в получении нуклеотидных последовательностей требуемых размеров: *TM1788* – 750 п.н., *anxA5-add* – 2000 п.н. и *SSO\_RS12375-taq* – 2800 п.н. (рис. 1).



М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации генов *TM1788* (1), *anxA5-add* (2) и *SSO\_RS12375-taq* (3)

На следующем этапе проводили линеаризацию вектора pET42mut с помощью ПЦР. Праймеры для линеаризации вектора подбирали таким образом, чтобы при встраивании в плазмиду на 3'-окончание целевого гена добавлялась последовательность нуклеотидов, обеспечивающая наличие дополнительного октагистидинового олигопептида на С-конце целевого белка.

Затем проводили постановку ПП-ПЦР которая, в отличие от стандартной ПЦР, требует наличия в векторе и вставке перекрывающихся комплементарных участков, добавляемых на стадии клонирования целевых генов. Таким образом, интересные гены *TM1788*, *anxA5-add* и *SSO\_RS12375-taq* были встроены в плазмиду pET42mut. Полинуклеотидным материалом,

полученным в результате постановки ПП-ПЦР, трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL. Из выросших трансформантов выделили плазмиды, которые в дальнейшем подвергли секвенированию для проверки наличия правильных нуклеотидных последовательностей. В результате были созданы высококопийные плазмиды pET42mut-dgc, pET42mut-A5A и pET42mut-STaq.

На следующем этапе работы проводили оценку эффективности синтеза ДГЦ, А5-АДазы и Диамант-ДНК-полимеразы в системе БСБ на основе S30 экстракта из *E. coli*. Конечная концентрация компонентов реакции составляла: 100 мМ HEPES-КОН (рН 8.0), 8 мМ ацетат магния, 90 мМ ацетат калия, 20 мМ фосфоенолпируват калия, набор аминокислот (каждая в концентрации

1.3 мМ), 0.15 мг/мл фолиевой кислоты, каждый из четырех рибонуклеозидтрифосфатов в концентрации 1 мМ, 0.05% азид натрия, 2% полиэтиленгликоль-8000, 0.04 мг/мл пируваткиназы, 5.5 мкг/мл Sso7d-РНК-полимеразы фага T7 [12], 0.3 мг/мл плазмидной ДНК, содержащей гены, кодирующие интересные белки, 0.5 мг/мл суммарной тРНК и экстракт S30, полученный из лизата клеток *E. coli* (30% от общего объема реакционной смеси). Инкубацию проводили в течение 6 ч при 30 °С с умеренным

перемешиванием. Для контроля синтеза ферментов, каждый час отбирали по 1 мкл для анализа ферментативной активности синтезируемых белков. В качестве отрицательного контроля использовали реакционную смесь с внесением вместо плазмидной ДНК соответствующего количества буферного раствора. Результаты синтеза Диамант-ДНК-полимеразы представлены на рис. 2; а рис. 3 отражает синтез ДГЦ и А5-АДазы.

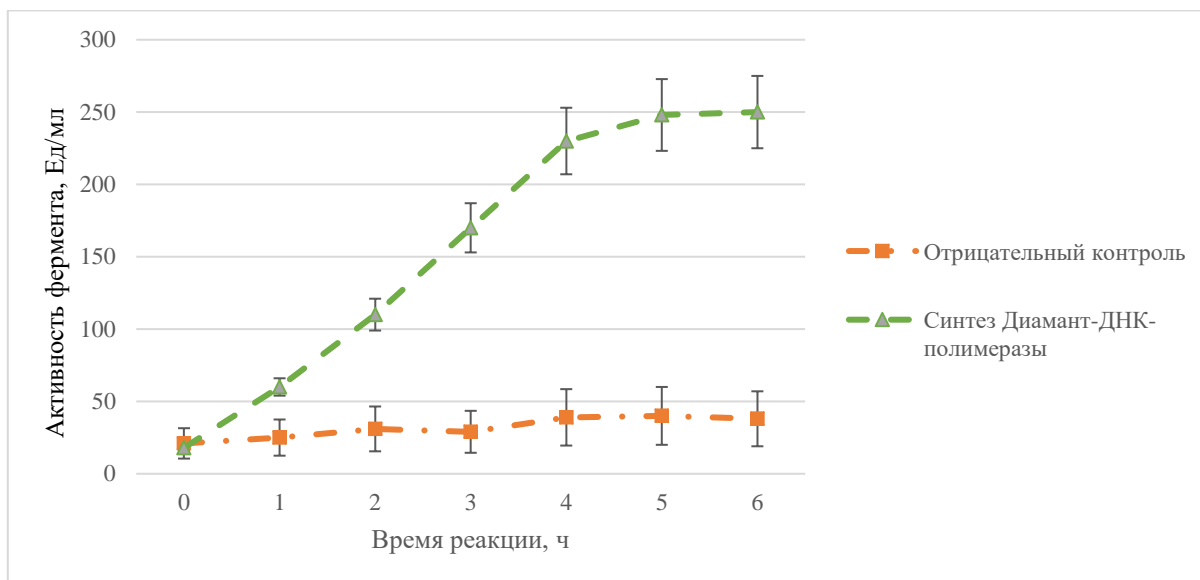


Рис. 2. Синтез Диамант-ДНК-полимеразы в системе БСБ

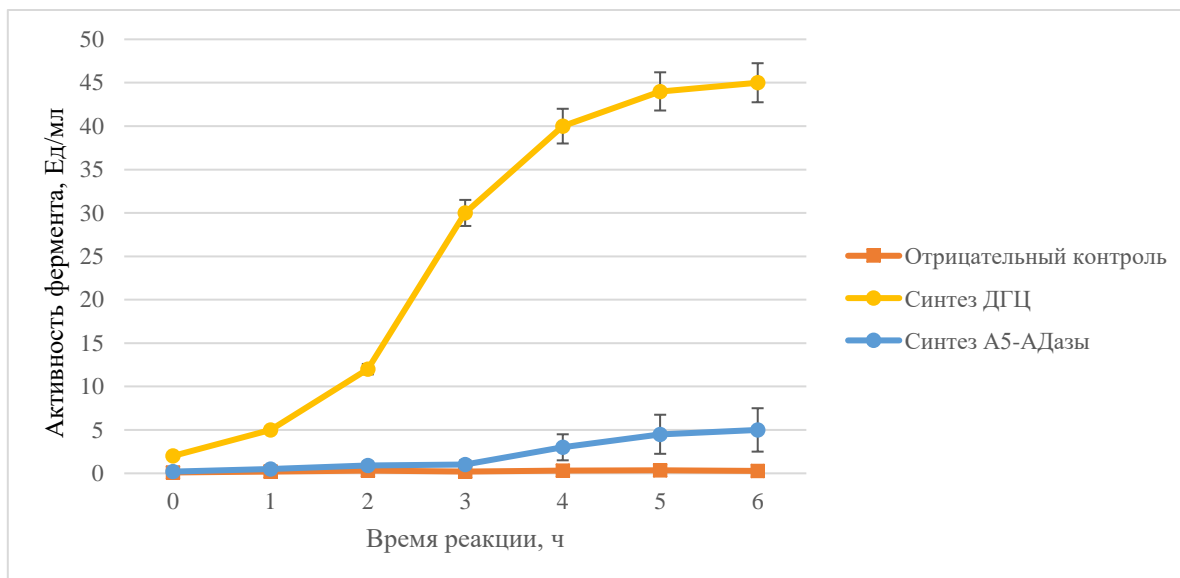


Рис. 3. Синтез ДГЦ и А5-АДазы в системе БСБ

Концентрации ДГЦ, А5-АДазы и Диамант-ДНК-полимеразы в результирующих препаратах, полученных при использовании в системе БСБ, составили 45 Ед/мл, 5 Ед/мл и 250 Ед/мл реакционных смесей, соответственно. В качестве сравнения следует отметить, что при получении данных белков в цельноклеточных системах экспрессии, их максимальная концентрация в культуральной жидкости составляла

соответственно 0.0036 Ед/мл [11], 0.1325 Ед/мл [9] и 240 Ед/мл [8]. Как можно заметить, экспрессия Диамант-ДНК-полимеразы близка к цельноклеточной, что может свидетельствовать о не полностью оптимизированном процессе синтеза этого фермента в системе БСБ.

**Заключение.**

Впервые система БСБ использована для получения бактериального фермента ДГЦ

*T. maritima*, и двух химерных белков (аннексина-A5 человека, слитого с АДазой *E. coli*, и ДНК-полимеразы бактерии *T. aquaticus*, слитой с ДНК-аффинным доменом бактерии *S. solfataricus*). После частичной оптимизации условий проведения процесса БСБ получено по 1 мл экспериментальных образцов ДГЦ, А5-АДазы и Диамант-ДНК-полимеразы с активностью 45 Ед/мл, 5 Ед/мл и 250 Ед/мл ферментного препарата, соответственно. По нашему мнению, синтез этих белков в системе БСБ может выступать в качестве варианта, альтернативного глубинному культивированию штаммов-продуцентов в ферментере.

#### Литература:

1. Gao W., Cho E., Liu Y., Lu Y. Advances and challenges in cell-free incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Front. Pharmacol.* 2019. Vol. 10. Art. 611. doi:10.3389/fphar.2019.00611
2. Gregorio N.E., Levine M.Z., Oza J.P. A user's guide to cell-free protein synthesis. *Meth. Protoc.* 2019. Vol. 2. Art. 24. doi:10.3390/mps2010024
3. Yue K., Zhu Y., Kai L. Cell-free protein synthesis: chassis toward the minimal cell. *Cells.* 2019. Vol. 8, № 4. Art. 315. doi:10.3390/cells8040315
4. Smith M.T., Varner C.T., Bush D.B., Bundy B.C. The incorporation of the A2 protein to produce novel Q $\beta$  virus-like particles using cell-free protein synthesis. *Biotechnol. Progr.* 2012. Vol. 28, N 2. P. 549–555.
5. Riedl S., Rinner B., Asslaber M., Schaidler H., Walzer S., Novak A., Lohner K., Zwegtlick D. In search of a novel target - phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. Vol. 1808. P. 2638–2645.
6. Зинченко А.И. Аденозин как потенциальная мишень для биотерапии рака. *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* 2016. № 4. С. 118–128.
7. Rao F., Pasunooti S., Ng Y., Zhuo W., Lim L., Liu A.W., Liang Z.X. Enzymatic synthesis of c-di-GMP using a thermophilic diguanylate cyclase. *Anal. Biochem.* 2009. Vol. 389. P. 138–142.
8. Korovashkina A.S., Kvach S.V., Eroshevskaya L.A., Zinchenko A.I. Production of thermostable DNA polymerase suitable for whole-blood polymerase chain reaction. *Biochemistry and Biotechnology: Research and Development* / Eds: S.D. Varfolomeev, G.E. Zaikov, L.P. Krylova. New York, Nova Science Publishers, Inc. 2012. P. 1–5.
9. Булатовский А.Б., Квач С.В., Ерошевская Л.А., Зинченко А.И. Создание штамма-продуцента химерного белка, состоящего из человеческого аннексина и бактериальной аденозиндезаминазы. *Докл. Нац. акад. наук Беларусі.* 2017. Т. 61, № 4. С. 89–95.
10. Казловский И.С., Рымко А.Н., Зинченко А.И. Модификация экспрессионной рЕТ-системы для использования в бесклеточном синтезе белка. *Сб. науч. трудов Института микробиологии НАН Беларусі «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты».* Т. 10. Минск, «Беларуская навука». 2018. С. 69–78.
11. Korovashkina A.S., Rymko A.N., Kvach S.V., Zinchenko A.I. Enzymatic synthesis of c-di-GMP using inclusion bodies of *Thermotoga maritima* full-length diguanylate cyclase. *J. Biotechnol.* 2012. Vol. 164, № 2. P. 276–280.
12. Казловский И.С., Зинченко А.И. Создание штамма-продуцента химерного белка, состоящего из РНК-полимеразы и ДНК-аффинного домена. *Докл. Нац. акад. наук Беларусі.* 2018. Т. 62, № 5. С. 601–607.