Рекомбинантные тельца включения как ферментные препараты

Зинченко А. И., Винтер М. А., Щёколова А. С.

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

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальные тельца включения (БТВ) представляют собой плотные нерастворимые белковые агрегаты, которые обычно образуются в процессе производства рекомбинантных белков в клетках микроорганизмов. С появлением технологии рекомбинантной ДНК БТВ часто наблюдались в клетках *Escherichia coli* и долгое время считались нежелательным побочным продуктом. На ранних этапах было разработано множество стратегий для предотвращения образования БТВ, поскольку для извлечения функциональных белков из этих агрегатов часто требовались трудоёмкие протоколы рефолдинга. Считалось, что ферменты активны только при правильном пространственном «сворачивании» белковой молекулы, а БТВ рассматривались как дефектные в этом отношении образования.

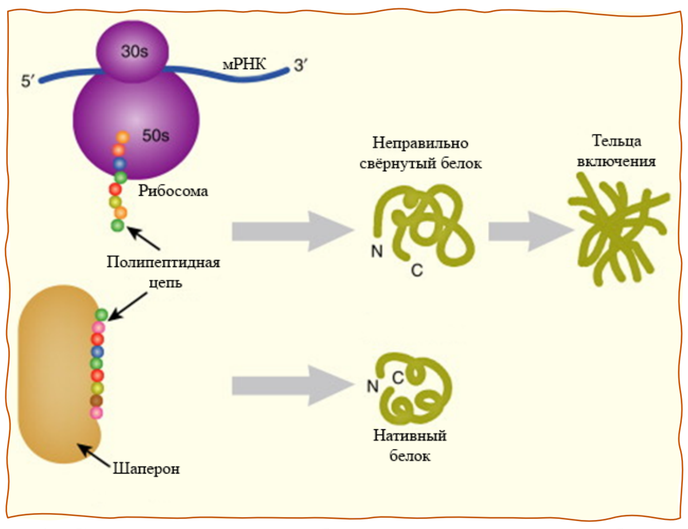


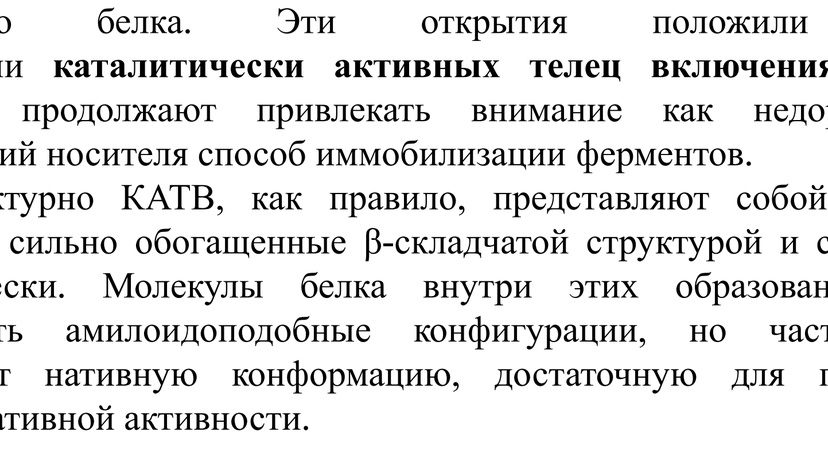
Рисунок 1. Схематическое изображение механизма образования телец включения [1]

Накопленные за последние десятилетия данные показали, что БТВ могут сохранять значительную часть нативного, биологически активного белка. Эти открытия положили начало концепции **каталитически активных телец включения (КАТВ)**, которые продолжают привлекать внимание как недорогой, не требующий носителя способ иммобилизации ферментов.

Структурно КАТВ, как правило, представляют собой белковые агрегаты сильно обогащенные β-складчатой структурой и стабильные механически. Молекулы белка внутри этих образований могут принимать амилоидоподобные конфигурации, но часть белков сохраняет нативную конформацию, достаточную для проявления ферментативной активности.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В рамках рассматриваемого направления исследований в Отраслевой лаборатории молекулярных био- и нанотехнологий Института микробиологии НАН Беларуси создан рекомбинантный штамм *E. coli* pTmadgc – продуцент дигуанилатциклазы (ДГЦ) *Thermotoga maritima* с мутацией в аллостерическом центре [2] и штамм *E. coli* ДАЦ-22 – продуцент рекомбинантной диаденилатциклазы (ДАЦ) *Bacillus thuringiensis* [3]. Продемонстрировано, что целевые ферменты продуцируются в форме телец включения и находятся в нерастворимой фракции клеточного лизата (рисунок 2).



M – положение и молекулярные массы (кДа) стандартных белков;
1 – клеточный лизат после индукции синтеза целевого белка;
2 – растворимая фракция клеточного лизата;
3 – нерастворимая фракция клеточного лизата, содержащая тельца включения

Рисунок 2. Электрофореграмма внутриклеточных белков штаммов-продуцентов рекомбинантных ДГЦ (А) и ДАЦ (Б)

Полученные тельца включения ДГЦ и ДАЦ обладают ферментативной активностью и способны катализировать реакции синтеза цикло-диГМФ и цикло-диАМФ, соответственно (рисунок 3).

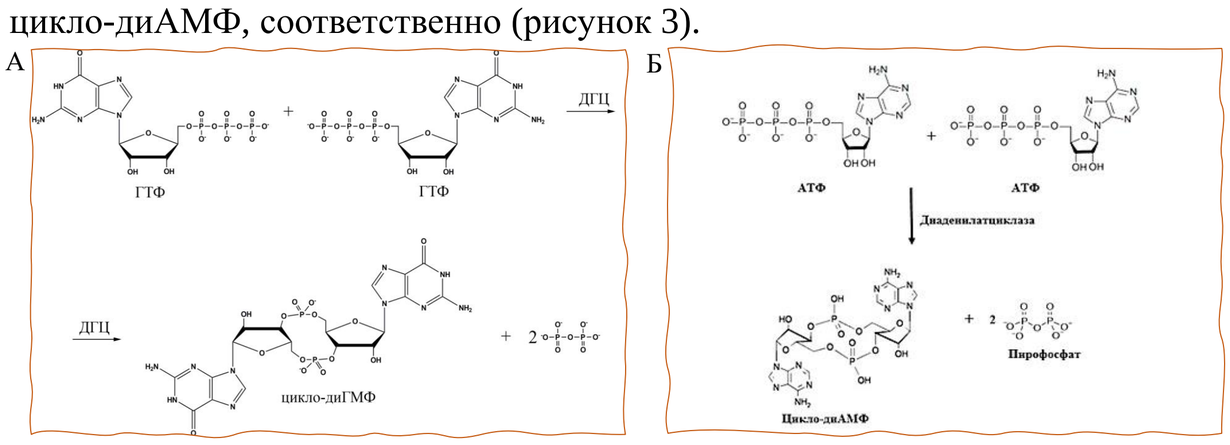


Рисунок 3. Схемы реакций синтеза цикло-диГМФ (А) и цикло-диАМФ (Б) с использованием ферментов, находящихся в форме телец включения

Продуцирующая способность штамма *E. coli* pTmadgc в отношении ДГЦ составила 80 мг/л, что превышает аналогичный показатель лучшего из описанных в литературе штаммов более чем в 5 раз. Кроме того, впервые показана возможность ферментативного синтеза цикло-ди-дезоксиГМФ (который ранее синтезирован химически) и прежде неописанного цикло-ди-араГМФ – фармакологически перспективных аналогов цикло-диГМФ [4].

Продуцирующая способность штамма *E. coli* ДАЦ-22 в отношении целевого фермента более чем в 2 раза превышает аналогичный показатель лучшего из описанных в литературе штаммов-аналогов [3]. Установлено, что препарат ДАЦ в виде КАТВ можно повторно (до 10 раз) использовать для эффективного синтеза цикло-диАМФ из АТФ (рисунок 4).

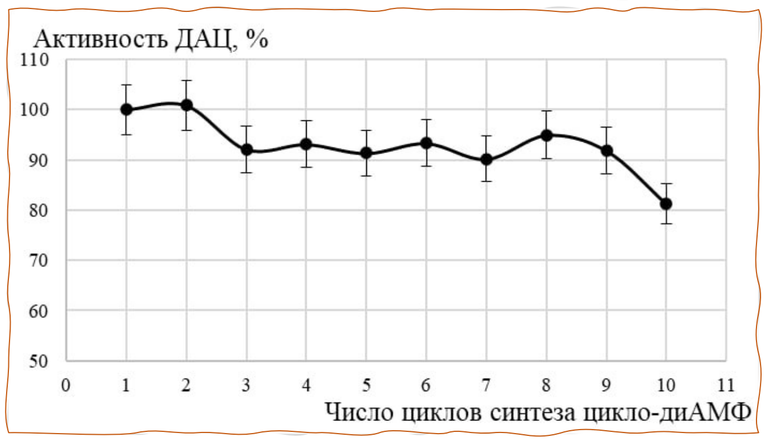


Рисунок 4. Операционная стабильность ДАЦ, иммобилизированной в составе телец включения

ВЫВОДЫ

На ранних этапах становления генной инженерии тельца включения, получаемые в процессе экспрессии рекомбинантных белков в бактериальных клетках, считались нежелательным побочным продуктом, требующим последующих трудоёмких процедур рефолдинга. Современные исследования показали, что получение белков в форме телец включения имеет определённые преимущества: при экспрессии токсичных для клетки-хозяина белков образование телец включения в неактивной форме повышает жизнеспособность клеток и выход целевого продукта; БТВ не подвержены воздействию протеаз, и поэтому белки в значительной степени защищены от протеолитической деградации ферментами клеток хозяина; благодаря высокой удельной плотности БТВ легко отделяются от клеточного лизата центрифугированием, упрощая процедуру очистки; многие ферменты сохраняют каталитическую активность в форме телец включения; благодаря своим особым структурным и функциональным характеристикам их потенциально можно использовать в качестве природных иммобилизованных ферментов.

ЛИТЕРТУРА

1. Clark, D. P. Biotechnology: Applying the Genetic Revolution/ D. P. Clark, N. J. Pazdernik. – 2-nd edition. – Academic Cell, 2015. – 850 p.

2. Enzymatic synthesis of c-di-GMP using inclusion bodies of Thermotoga maritima full-length diguanylate cyclase / A. S. Korovashkina, A. N. Rymko, S. V. Kvach, A. I. Zinchenko // Journal of Biotechnology. –2013. –Vol. 164, № 2. – P. 276–280.

3. Винтер, М. А. Гетерологичная экспрессия диаденилатциклазы в виде телец включения, обладающих ферментативной активностью / М. А. Винтер, И. С. Казловский., А. И. Зинченко // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 5. – С. 509–516.

4. Enzymatic synthesis of 2′-ara and 2′-deoxy analogues of c-di-GMP / A. S. Shchokolova, A. N. Rymko, S. V. Kvach [et al.] // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. – 2015. – Vol. 34, № 6. – P. 416–423.