УДК 60.604

БИОТЕХНОЛОГИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ РИБОНУКЛЕАЗ БАРНАЗЫ И БИНАЗЫА.А. Шульга¹, Е.В. Коновалова¹, Т.И. Лукьянова¹, В.А. Миткевич², А.А. Макаров², С.М. Деев¹¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Бактериальные рибонуклеазы (РНказы) вызывают значительный интерес в качестве потенциальных лекарственных средств. Судя по количеству научных публикаций, наиболее популярными являются РНказы барназа и биназа, продуцируемые в природе бактериями *Bacillus amyloliquefaciens* и *Bacillus intermedius*, соответственно [1]. Барназа и биназа очень похожи по структуре – гомология аминокислотных последовательностей достигает 82 %, а третичные структуры практически совпадают. Ферментативные свойства также очень похожи. РНказы не имеют дисульфидных связей и не нуждаются ни в посттрансляционных модификациях, ни в ионах двухвалентных металлов, ни в каких-либо других компонентах для проявления своей каталитической функции. Поэтому ферменты активны в любой клетке, в которую попадают. РНказы обладают цитотоксическим действием на многие виды опухолевых клеток и, в связи с этим, представляет интерес для приготовления на их основе эффективных лекарственных средств, для лечения некоторых видов рака [2, 3]. Одним из наиболее перспективных направлений разработки противоопухолевых препаратов на основе РНказ является конъюгация их с другими биологически активными молекулами с целью повысить избирательность действия на опухолевые клетки [4]. Бациллярные клетки синтезируют специальный белок барстар для защиты от токсичного действия барназы. Барстар образует очень крепкую связь с барназой, полностью блокируя ее активность (коэффициент ассоциации прим. 10^{14} M^{-1}) [5]. У обоих белков N- и C-концевые части локализованы на поверхности белковых глобул вне интерфейса их взаимодействия и доступны для соединения с другими белками в составе рекомбинантных конструкций. Способность барназы формировать высокоаффинный комплекс с барстаром позволяет использовать их в качестве метки (или вектора) для конъюгации с другими белками и пептидами по типу «молекулярного конструктора» для достижения различных целей, например, для самосборки гетеромерных надмолекулярных структур [6]. Бактериальные рибонуклеазы являются также эффективным противовирусным средством, что является особенно актуальным на настоящий момент. Барназа подавляла инфекцию вирусов герпеса и бешенства в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo* [7–9]. Биназа блокировала размножение вируса гриппа H1N в клеточной линии легких человека A549 [10]. Аналогичные эффекты наблюдали на линии клеток, зараженных коронавирусом ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) и коронавируса человека 229E (HCoV-229E) [11].

Сохраняющаяся популярность барназы и биназы диктует необходимость получения этих белков в больших количествах. Вместе с тем, имеющиеся в распоряжении исследователей экспрессионные системы для РНказ барназы и биназы [12,13] характеризуются низким и нестабильным уровнем синтеза белка. Кроме того, препараты РНказ, получаемые с их помощью, отличаются гетерогенностью из-за неправильного процессинга лидерного пептида щелочной фосфатазы *E. coli* rhoA. В данной работе вышеупомянутые проблемы были решены за счет замены лидерной последовательности rhoA на лидерную последовательность термостабильного токсина STII *E. coli* и постановки модифицированных генов под транскрипционный контроль T7 промотора. Сборку генов, кодирующих РНказы барназу и биназу, имеющих на N-конце сигнальный пептид STII, осуществляли при помощи метода ПЦР. Плазмиды для экспрессии генов барназы и биназы получали путем клонирования фрагментов ДНК, содержащих модифицированные гены барназы / биназы и барстар, в вектор pET9a по сайтам рестрикции *NdeI* и *BamHI*. Для преодоления токсичности РНказ в экспрессионные конструкции вставляли ген природного ингибитора барназы, барстар, под собственным промотором. Для лучшего контроля за активностью генов экспрессионные кассеты, направляющие синтез РНказ, были интегрированы в хромосому бактериальных клеток с помощью метода рекомбинирования, подробно описанного в работе [14]. Метод основан на использовании мутантных RED белков бактериофага λ Echo, Beta и Gam, чья роль состоит в защите линейного двуцепочечного фрагмента ДНК от деградации внутриклеточными нуклеазами, и его последующей интеграции в заранее выбранное место бактериальной хромосомы. При помощи метода ПЦР были наработаны фрагменты ДНК, содержащие экспрессионную кассету и ген устойчивости к антибиотику (канамицину), снабженные на концах обширными последовательностями ДНК, гомологичными хромосомному локусу, выбранному для встраивания экспрессионной кассеты.

Протяженность гомологичных последовательностей составляла примерно 600 н.п., что должно было способствовать увеличению эффективности рекомбинирования. При помощи метода электропорации наработанные фрагменты ДНК были перенесены в клетки BL21(DE3), которые синтезировали белки RED системы. После регенерации клетки были высеяны на твердую питательную среду, содержащую антибиотик канамицин. Как правило, в каждом эксперименте получали от двух до шести клонов, устойчивых к канамицину. Факт встраивания экспрессионной кассеты в хромосому доказывали при помощи метода ПЦР со специально сконструированных праймеров, часть из которых имела место посадки вблизи хромосомного локуса, выбранного в качестве места встраивания экспрессионной кассеты, другая часть праймеров отжигалась в пределах экспрессионной кассеты. В результате были получены несколько бесплазмидных штаммов, содержащих в своей хромосоме единичную копию экспрессионной кассеты барназы или биназы.

В случае бесплазмидного рекомбинантного штамма в клетке содержится всего лишь одна копия целевого гена. Тогда как в плазмидном штамме копияность такого гена доходит до 15–20. Общеизвестным является представление, что увеличение копияности гена должно приводить к увеличению продуктивности штамма. В данном исследовании нами была проверена правильность такой концепции. Выращивание штаммов проводили в параллели и в одних и тех же условиях. Для упрощения эксперимента использовали автоиндукционную среду [15]. Бесплазмидные штаммы воспроизводимо давали либо сравнимый, либо значительно более высокий выход РНКаз, чем плазмидный штамм. Можно предположить, что причиной этого является более высокая стабильность таких штаммов, связанная с растянутым во времени синтезом целевого белкового продукта, не перегружающего синтетический аппарат клетки. Кроме того, известно, что процесс секреции в *E. coli* протекает более эффективно, если растянут во времени. Для такого токсичного продукта, каким является РНКаз, это имеет решающее значение. Взрывной синтез белка может приводить к его накоплению в цитоплазме в непротессированном виде, что в случае с РНКазой является абсолютно недопустимым.

Сравнительный экспрессионный анализ бесплазмидных рекомбинантных штаммов, продуцирующих РНКазы барназу и биназу, и аналогичных штаммов, в которых синтез РНКаз обеспечивался плазмидами, выявил превосходные характеристики бесплазмидных штаммов. Суммарный выход белков при выращивании в небольших объемах культуры составлял примерно 400 мг/л для барназы и 150 мг/л для биназы. Как правило, значительная часть белка оставалась в периплазматическом клеточном пространстве – не менее половины. Автоиндукционная среда ZYM-5052 гарантировала высокие выходы белков и хорошую воспроизводимость результатов. Оптимальная температура для выращивания штаммов – 37°C. Предпочтительная продолжительность культивирования в колбах – не более 24 часов.

Был разработан эффективный метод выделения и очистки РНКаз барназы и биназы, который включал (1) экстракцию белков из клеточной периплазмы при помощи метода осмотического шока, (2) осаждение белков из экстракта при помощи сульфата аммония, (3) диализ, (4) хроматографию на колонке, набитой катионообменником S-Sepharose, (5) гель фильтрацию на колонке, набитой Sephadex G50 SF.

Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 18–04–00365а и № 18–29–08024мк)

ЛИТЕРАТУРА

- [1] – T.G. Balandin, et al. (2011) FEBS J. 278(19): 3633–3643.
- [2] – E. Edelweiss et al. (2008) PLoS ONE 3. e2434.
- [3] – A.A. Makarov, A. Kolchinsky, O.N. Ilinskaya (2008) Bioessays 30(8):781–790.
- [4] – S.M. Deyev (2011) Invest. New Drugs 29(1): 22–32.
- [5] – R.W. Hartley (1989) Trends Biochem. Sci. 14: 450–454.
- [6] – С.М. Деев, Е.Н. Лебедево (2015) Биоорганическая химия 41: 539–552.
- [7] – I.I. Alekseeva et al. (1981) Antibiotiki 26(7): 527–532.
- [8] – С.В. Грибенча и др. (2004) Вопр. вирус. 49: 38–41.
- [9] – С.В. Грибенча и др. (2004) Вопр. вирус. 51: 41–44.
- [10] – M.R. Shah, O.N. Ilinskaya (2013) Acta Naturae 5(4): 44–51.
- [11] – C. Müller (2017) BioNanoSci. 7, 294–299.
- [12] – R.W. Hartley (1988) J. Mol. Biol. 202: 913–915.
- [13] – A.L. Okorokov, R.W. Hartley, K.I. Panov (1994) Protein Expr. Purif. 5: 547–552.
- [14] – M. Nakayama, O. Ohara (2005) Biotechniques 38: 917–924.
- [15] – F.W. Studier (2005) Protein Expression Purif., 41(1): 207–234