

ISSN 1561-8323 (Print)  
ISSN 2524-2431 (Online)

## БИОЛОГИЯ BIOLOGY

УДК 579.66:577.113.3:577.15  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-5-509-516>

Поступило в редакцию 26.04.2022  
Received 26.04.2022

**М. А. Винтер, И. С. Казловский, член-корреспондент А. И. Зинченко**

*Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

### ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ДИАДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ВИДЕ ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЯ, ОБЛАДАЮЩИХ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

**Аннотация.** С помощью техники рекомбинантной ДНК создан новый бактериальный штамм *Escherichia coli* ДАЦ-22, клетки которого способны осуществлять гетерологичную экспрессию диаденилатциклазы *Bacillus thuringiensis* – фермента, катализирующего реакцию трансформации аденозин-5'-трифосфата в циклический 3',5'-диаденилат (цикло-ди-АМФ). Для получения этого штамма в качестве клеток-реципиентов плазмиды pET42a+ со встроенным геном *disA*, кодирующим диаденилатциклазу *B. thuringiensis*, впервые были использованы клетки *E. coli* «Rosetta (DE3) pLysS». Клетки нового штамма способны продуцировать гетерологичную диаденилатциклазу, около 90 % которой локализовано во фракции каталитически активных телец включения. Продуцирующая способность полученного штамма в отношении диаденилатциклазы, находящейся в составе каталитически активных телец включения, составила 720 ед/л культуральной жидкости. Образующие этим штаммом тельца включения могут быть использованы в технологии получения фармакологически перспективного цикло-ди-АМФ.

**Ключевые слова:** *Escherichia coli*, генная инженерия, рекомбинантный штамм, *Bacillus thuringiensis*, гетерологичная экспрессия гена, тельца включения, диаденилатциклаза, цикло-ди-АМФ

**Для цитирования.** 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. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-5-509-516>

**Margarita A. Vinter, Illia S. Kazlouski, Corresponding Member Anatoly I. Zinchenko**

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

### HETEROLOGOUS EXPRESSION OF DIADENYLATE CYCLASE IN THE FORM OF INCLUSION BODIES WITH ENZYMATIC ACTIVITY

**Abstract.** Using the DNA recombination technique, a new bacterial strain *Escherichia coli* DAC-22 was derived, whose cells are able to carry out the heterologous expression of *Bacillus thuringiensis* diadenylate cyclase – the enzyme catalyzing the reaction of adenosine-5'-triphosphate (ATP) transformation into cyclic 3',5'-diadenylate (cyclo-di-AMP). To derive the strain, *E. coli* “Rosetta (DE3) pLysS” cells were originally used as recipients of plasmid pET42a+ with the inserted gene *disA* encoding diadenylate cyclase of *B. thuringiensis*. The cells of the recombinant strain are able to produce heterologous diadenylate cyclase localized predominantly (by 90 %) in the fraction of the catalytically active inclusion bodies. The productivity of the new strain with respect to diadenylate cyclase structurally arranged as the inclusion bodies was 720 units/l of cultural fluid. The inclusion bodies formed by the newly engineered strain are intended for use in the technology of producing pharmacologically promising cyclo-di-AMP.

**Keywords:** *Escherichia coli*, genetic engineering, recombinant strain, *Bacillus thuringiensis*, heterologous gene expression, inclusion bodies, diadenylate cyclase, cyclo-di-AMP

**For citation.** Vinter M. A., Kazlouski I. S., Zinchenko A. I. Heterologous expression of diadenylate cyclase in the form of inclusion bodies with enzymatic activity. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 5, pp. 509–516 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-5-509-516>

**Введение.** Диаденилатциклаза (КФ 2.7.7.85) катализирует реакцию трансформации аденозин-5'-трифосфата (АТФ) в циклический 3',5'-диаденилат (цикло-ди-АМФ) формулы, представленной на рис. 1.

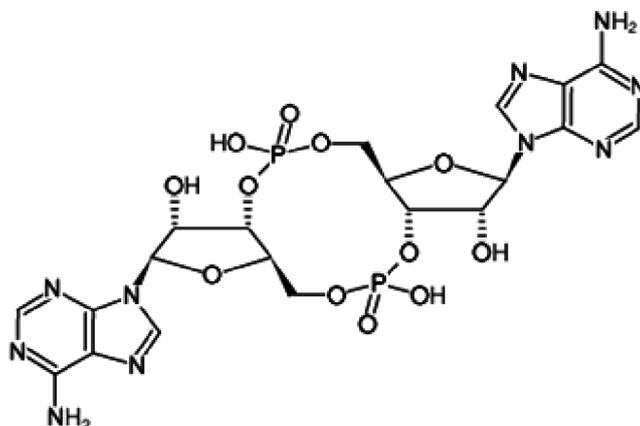


Рис. 1. Структурная формула цикло-ди-АМФ

Fig. 1. Structural formula of cyclo-di-AMP

Указанное соединение было открыто в 2008 г. в составе грамположительных бактерий и архей. Цикло-ди-АМФ играет роль патоген-ассоциированного молекулярного паттерна, который при попадании в организм человека и позвоночных животных индуцирует синтез интерферонов и других провоспалительных цитокинов [1]. Благодаря таким свойствам, цикло-ди-АМФ рассматривается в качестве очень перспективного соединения, которое может быть использовано в медицине в качестве терапевтических средств и адъювантов для вакцин [2–4].

В настоящее время цикло-ди-АМФ получают главным образом путем многостадийного экологически «вредного» химического синтеза [5]. Альтернативный биокаталитический подход к получению цикло-ди-АМФ основывается на одностадийном процессе конденсации двух молекул АТФ под действием бактериального фермента – рекомбинантной диаденилатциклазы.

Очевидно, что использование цикло-ди-АМФ в вакцинах или в качестве индуктора интерферонов потребует производства его в промышленных масштабах. Эта проблема могла бы быть решена с помощью генно-инженерных бактериальных штаммов, способных к суперпродукции диаденилатциклазы.

Однако несмотря на хорошую изученность и привлекательность штаммов *Escherichia coli*, гетерологичная экспрессия генов в клетках этой бактерии часто сопровождается агрегацией «сверхпродуцированных» целевых белков с формированием водонерастворимых образований, которые получили наименование «тельца включения» [6; 7].

Ферменты, включенные в такие тельца, для проявления своей активности обычно требуют довольно трудоемкой процедуры солиubilизации. Однако в литературе описаны случаи, когда процедура рефолдинга телец включения не требуется, поскольку ферменты, выпадая в осадок, не теряют своей активности [8; 9].

Следует отметить, что, поскольку цикло-ди-АМФ в повышенных концентрациях губителен для клеток, активность этого фермента у диких бактериальных штаммов чрезвычайно низка. В связи с этим штаммы-суперпродуценты диаденилатциклазы каноническими селекционно-генетическими методами не получены.

Известны рекомбинантные штаммы-продуценты, способные после индукции экспрессии клонированных генов диаденилатциклазы продуцировать этот фермент в повышенных количествах. Так, описан бактериальный рекомбинантный штамм *Mycobacterium tuberculosis* BCG-disA-OE, в котором ген диаденилатциклазы (*disA*) слит с сильным микобактериальным промотором *hsp60* в векторе pSD5. По сравнению с родительским штаммом дикого типа, рекомбинант-

ный штамм характеризуется повышенным в 300 раз уровнем экспрессии гена *disA* и в 15 раз повышенной продукцией цикло-ди-АМФ [10]. При этом авторами работы уровень экспрессии гена, кодирующего диаденилатциклазу, зарегистрирован только по экспрессии ее мРНК с использованием количественной ПЦР в режиме реального времени. Данных по активности штамма в отношении рекомбинантной диаденилатциклазы, выраженной в ед. активности/мл культуральной жидкости (КЖ) в работе не приведены и рассчитать их не представляется возможным.

Описаны три штамма-продуцента диаденилатциклазы, представляющие собой клетки *E. coli* BL21(DE3), трансформированные плазмидами pGP1973, pGP1974 и pGP1975, несущими клонированные гены трех различных изоформ (DisA, CdaA и CdaS) диаденилатциклазы бактерии *Bacillus subtilis* [11]. Данные, позволяющие оценить продуцирующую способность штаммов в отношении рекомбинантной диаденилатциклазы (в единицах активности на 1 л КЖ), в работе не приведены.

Известен рекомбинантный штамм *E. coli* pBtdac [12], полученный путем трансформации штамма-реципиента *E. coli* BL21(DE3) плазмидой pET42a(+) со встроенным геном, кодирующим диаденилатциклазу *B. thuringiensis*. Продуктивность штамма в отношении диаденилатциклазы (находящихся в тельцах включения) относительно невысокая и составляет 330,75 ед/л КЖ.

Цель исследования – изучение возможности создания рекомбинантного штамма *E. coli* на основе более эффективной системы гетерологичной экспрессии гена диаденилатциклазы.

**Материалы и методы исследования.** Источником структурного гена, кодирующего аминокислотную последовательность диаденилатциклазы, служила хромосомная ДНК штамма бактерий *B. thuringiensis* BT407 (Novagen, США). ДНК выделяли с помощью фенол-хлороформного метода с дополнительной очисткой при помощи цетавлона [13].

Ген *disA* синтезировали с помощью ПЦР, используя «Flash полимеразу» (АртБиоТех, Беларусь) и синтетические олигонуклеотидные праймеры: DisA\_2-F (5'-GTGGTGGTCCACAACATGGAAGAAAATAAGCAACGTG-3') и DisA\_2-R (5'-GTGGTGGTGGTGGTCTCATTTGTGTCTACTCATA TATAGATGCTCT-3'). На 5'-окончания праймеров встроены нуклеотидные последовательности (подчеркнуты), комплементарные плазмиде pET42a+ (Novagen, США).

Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1 %-ном агарозном геле. Продукт, соответствующий гену *disA*, выделяли и встраивали в вектор pET42a+, предварительно линеаризованный методом ПЦР с использованием праймеров 42Int\_R (5'-GTTGTGGACCACCACCATATGTATATCTCCTTCTT-3') и pET42lin\_2-F (5'-GAGCATCACCATCACCACCACCACCACTAATTG-3'). Сборку полученных фрагментов ДНК (линеаризованного вектора и гена, кодирующего диаденилатциклазу) осуществляли методом продолжительной перекрывающейся ПЦР [14].

Полученной ПЦР-смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* «Rosetta(DE3) pLysS» фирмы Novagen (США), полученные стандартным кальциевым методом [13], с последующим высевом на плотную питательную среду LB (1 % триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 1 % NaCl, 1 % глюкоза), содержащую канамицин в концентрации 50 мкг/мл. Три выросшие одиночные колонии анализировали на наличие вставки гена *disA* методом ПЦР, используя праймер к T7-промотору 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАGGG-3', входящему в состав плазмиды pET24a+, и праймер к гену *disA* – DisA\_2-R. Продукты амплификации были подвергнуты гель-электрофорезу в 1 %-ном агарозном геле. Этот эксперимент показал наличие в клетках-реципиентах плазмиды pET24a+ со вставкой гена *disA*, которую мы обозначили pET-intDisA.

Так был получен рекомбинантный штамм бактерий *E. coli*, клетки которого способны экспрессировать гетерологичную диаденилатциклазу *B. thuringiensis*, обозначенный нами как *E. coli* ДАЦ-22.

Для культивирования *E. coli* ДАЦ-22 10 мл суточной культуры клеток помещали в две колбы Эрленмейера объемом 2 л, содержащие по 500 мл среды LB с канамицином (50 мкг/мл; pH 7,0), и растили при 37 °С на качалке при 200 об/мин. После достижения культуральной средой оптической плотности 0,6 ( $\lambda_{600\text{нм}}$ ) вносили индуктор – изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (CarlRoth, Германия) до конечной концентрации 0,5 мМ и продолжали культивирование в тече-

ние 3 ч. По окончании выращивания клетки осаждали центрифугированием (8000 g; 5 мин), ресуспендировали в 50 мМ фосфатном буфере (рН 8,0), содержащем 300 мМ NaCl и 10 мМ имидазола, получая клеточную биомассу в количестве около 5 г.

Для выделения телец включения из клеток бактерий их разрушали ультразвуком с последующим центрифугированием. Полученный осадок промывали раствором, содержащим мочевины (1 М) и тритон X-100 (2 %), дважды промывали 50 мМ трис-HCl-буфером (рН 8,0), содержащим 0,1 М NaCl, и ресуспендировали в том же буфере.

Активность диаденилатциклазы определяли, как описано нами в [8] при анализе дигуанилатциклазы, заменяя в реакционной смеси ГТФ на АТФ. При этом за единицу активности принимали количество фермента, образующее 1 мкмоль цикло-ди-АМФ за 1 мин протекания реакции.

Приведенные в работе экспериментальные данные представляют собой доверительный интервал среднего арифметического для 95 %-ного уровня вероятности.

**Результаты и их обсуждение.** Недостатком единственного найденного в литературе штамма-продуцента диаденилатциклазы с охарактеризованной активностью является его сравнительно невысокая продуцирующая способность в отношении изучаемого фермента. Это обусловлено, по-видимому, недостаточно эффективной системой экспрессии гетерологичного гена, используемой для создания рекомбинантного штамма-продуцента.

В настоящем исследовании для создания штамма *E. coli*, продуцирующего диаденилатциклазу, было решено впервые использовать в качестве штамма-реципиента штамм *E. coli* «Rosetta(DE3) pLysS», в клетки которого была внедрена плазида (обозначенная нами pET-intDisA), несущая ген, кодирующий диаденилатциклазу *B. thuringiensis*. В результате этого был получен штамм *E. coli*, продуцирующий гетерологичную диаденилатциклазу в виде каталитически активных телец включения. Полученный штамм обладает более высокой продуцирующей способностью в отношении гетерологичной диаденилатциклазы, чем штамм-прототип *E. coli* pBtdac [12].

На рис. 2 представлены результаты оценки уровня продукции целевого белка в условиях глубинного культивирования. Из электрофореграммы, полученной при помощи белкового гель-

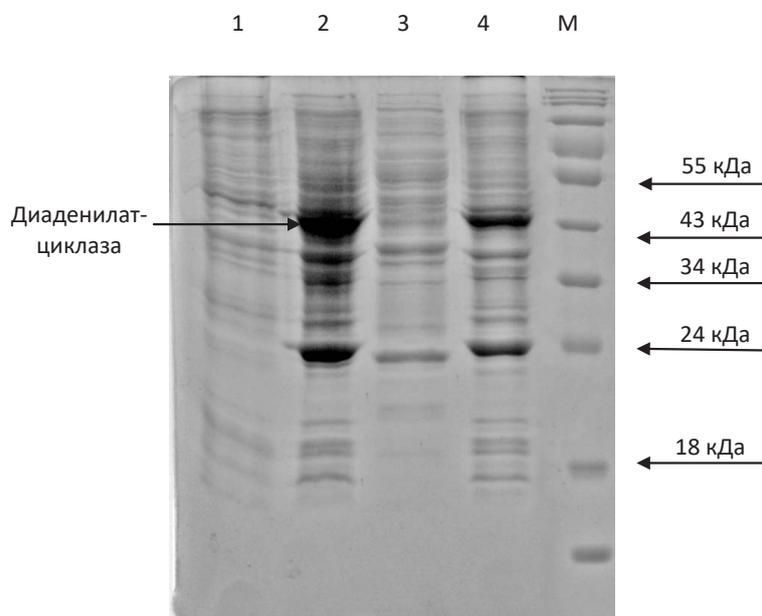


Рис. 2. Электрофореграмма внутриклеточных белков *E. coli* ДАЦ-22. Дорожки: 1 – клеточный лизат до индукции; 2 – клеточный лизат после индукции; 3 – супернатант клеточного лизата; 4 – тельца включения; М – маркер молекулярной массы белков

Fig. 2. Electrophoregram of the protein composition of *E. coli* ДАЦ-22. Tracks: 1 – cell lysate before induction; 2 – cell lysate after induction; 3 – a cell lysate supernatant; 4 – inclusion bodies; M – protein molecular weight markers

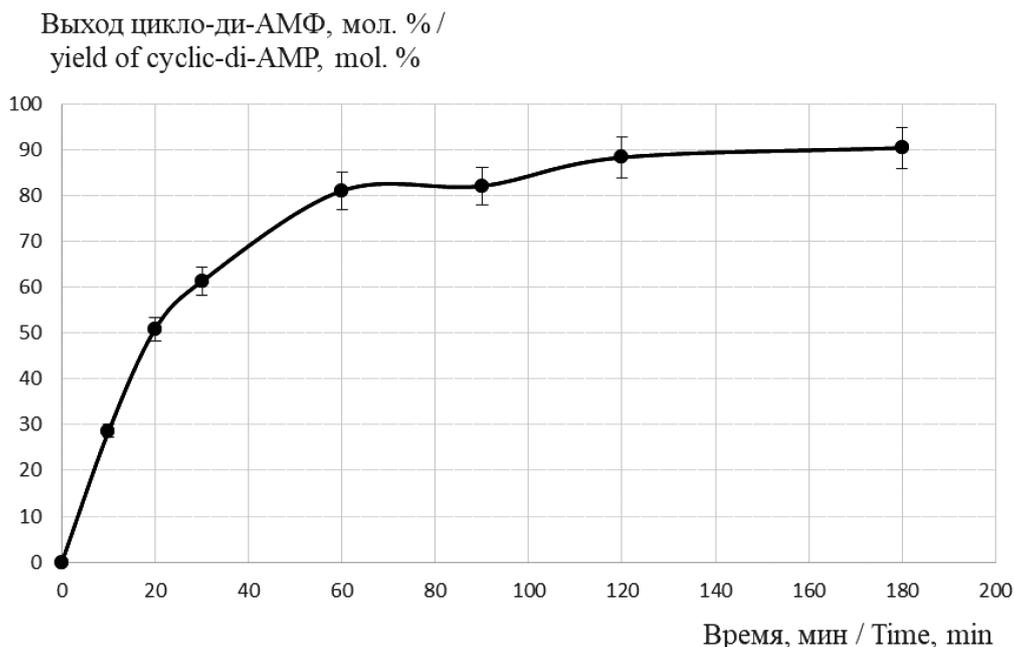


Рис. 3. Динамика накопления цикло-ди-АМФ в реакции, катализируемой тельцами включения с рекомбинантной диаденилатциклазой

Fig. 3. Dynamics of accumulation of cyclo-di-AMP in the reaction catalyzed by inclusion bodies with recombinant diadenylate cyclase

электрофореза в 12 %-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, видно, что диаденилатциклаза накапливается в клетках бактерий в основном в виде телец включения.

Далее тельца включения, полученные как указано в разделе «Материалы и методы исследования», внесли в реакционную смесь (конечный объем 10 мл), содержащую (мМ): хлорид магния – 10, трис-НСl-буфер (рН 8,0) – 10, АТФ – 5, и инкубировали при 55 °С в течение 2 ч. В этих условиях (рис. 3) выход реакции достиг более 90 % от теоретически возможного. Рассчитанная продуцирующая способность штамма составила 720 ед/л КЖ.

Целевой продукт выделили из реакционной смеси путем хроматографии на колонке со смолой «DEAE-Toyorearl 650 M» (Toyo soda, Япония) (Cl<sup>-</sup>) с использованием линейного градиента хлорида натрия (0–500 мМ). Элюат упарили в 200 раз с помощью роторного испарителя при 55 °С. Полученный раствор нанесли на колонку с сефадексом G-10 (Serva, Германия), и целевой продукт элюировали водой и высушили под вакуумом. Получили 13 мг хроматографически чистого цикло-ди-АМФ. Таким образом, выход изолированного целевого продукта в расчете на исходный АТФ составил 75 % от теоретически возможного.

Элементный состав, хроматографическая подвижность при хроматографировании на тонкослойных пластинках Silica gel 60 F254 (Merck, Германия) в системе растворителей диоксан–вода–25 % аммиак (4 : 3 : 0,25), а также параметры УФ-спектра целевого продукта совпали с соответствующими характеристиками заведомо известного образца – цикло-ди-АМФ (Jena Bioscience, Германия).

Таким образом, нами показана возможность использования телец включения для эффективного синтеза цикло-ди-АМФ. Такой подход для получения препарата диаденилатциклазы позволяет значительно повысить продуцирующую способность штамма-продуцента, а также, возможно, неоднократно использовать тельца включения для относительно дешевого метода получения фармакологически перспективного циклического динуклеотида.

В плане обсуждения результатов следует отметить, что в настоящее время гетерологичная экспрессия белков играет ключевую роль в биотехнологии. При этом, образование телец вклю-

чения при гетерологичной экспрессии белков, особенно экспрессии эукариотических белков в прокариотических хозяевах, включая *E. coli*, является одной из самых трудоемких задач для исследователей и разработчиков.

В попытке свести к минимуму образование телец включения и, таким образом, повысить выход растворимых белков, было предложено много стратегий, включая генетические подходы (например, снижение дозы целевых генов), физические методы (например, снижение температуры культивирования), физиологические приемы (например, совместное производство с шаперонами или ограничение источников питания) [15]. Успех применения этих процедур непредсказуем, поэтому они не привели к созданию общепринятого протокола, применимого ко всем белкам, образующим тельца включения.

С другой стороны, тельца включения представляют собой относительно стабильные белковые отложения. Их легко изолировать при разрушении клеток простыми физическими средствами и использовать в качестве ферментных препаратов, как уже было неоднократно продемонстрировано в литературе.

**Заключение.** Методами генной инженерии был изолирован и клонирован ген, кодирующий диаденилатциклазу *B. thuringiensis*. С использованием вектора pET42a+ создана генетическая конструкция, несущая ген диаденилатциклазы, которой был впервые трансформирован штамм *E. coli* «Rosetta(DE3) pLysS». Полученный рекомбинантный штамм способен осуществлять гетерологичную экспрессию диаденилатциклазы, около 90 % которой оказалось локализовано во фракции телец включения. Продуцирующая способность нового штамма в отношении диаденилатциклазы, находящейся в составе каталитически активных телец включения, составила 720 ед/л КЖ. Полученные тельца включения могут выступать в качестве ферментного препарата для использования в технологии получения фармакологически перспективного цикло-ди-АМФ.

### Список использованных источников

1. A decade of research on the second messenger c-di-AMP / W. Yin [et al.] // FEMS Microbiol. Rev. – 2020. – Vol. 44, N 6. – P. 701–724. <https://doi.org/10.1093/femsre/uaaa019>
2. Intranasal delivery of influenza rNP adjuvanted with c-di-AMP induces strong humoral and cellular immune responses and provides protection against virus challenge / M. V. Sanchez [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, N 8. – Art. e104824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104824>
3. Cyclic di-adenosine monophosphate: a promising adjuvant candidate for the development of neonatal vaccines / D. Lirussi [et al.] // Pharmaceutics. – 2021. – Vol. 13, N 2. – Art. 188. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020188>
4. Yan, H. The Promise and challenges of cyclic dinucleotides as molecular adjuvants for vaccine development / H. Yan, W. Chen // Vaccines. – 2021. – Vol. 9, N 8. – Art. 917. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080917>
5. Chemical synthesis, purification, and characterization of 3'-5'-linked canonical cyclic dinucleotides (CDNs) / C. Wang [et al.] // Meth. Enzymol. – 2019. – Vol. 625. – P. 41–59. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.04.022>
6. Villaverde, A. Protein aggregation in recombinant bacteria: Biological role of inclusion bodies / A. Villaverde, M. M. Carrio // Biotechnol. Lett. – 2003. – Vol. 25, N 17. – P. 1385–1395. <https://doi.org/10.1023/a:1025024104862>
7. Schramm, F. D. Protein aggregation in bacteria / F. D. Schramm, K. Schroeder, K. Jonas // FEMS Microbiol. Rev. – 2020. – Vol. 44, N 1. – P. 54–72. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz026>
8. Enzymatic synthesis of 2'-ara and 2'-deoxy analogues of c-di-GMP / A. S. Shchokolova [et al.] // Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids. – 2015. – Vol. 34, N 6. – P. 416–423. <https://doi.org/10.1080/15257770.2015.1006775>
9. Thermostable adenosine 5'-monophosphate phosphorylase from *Thermococcus kodakarensis* forms catalytically active inclusion bodies / S. Kamel [et al.] // Sci. Rep. – 2021. – Vol. 11, N 1. – Art. 16880. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96073-5>
10. Re-engineered BCG overexpressing cyclic di-AMP augments trained immunity and exhibits improved efficacy against bladder cancer / A. K. Singh [et al.] // Nat. Commun. – 2022. – Vol. 13, N 1. – Art. 878. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28509-z>
11. 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.395491>

12. Создание рекомбинантного штамма *Escherichia coli* – продуцента диаденилатциклазы и ее использование для синтеза цикло-ди-АМФ / И. С. Казловский [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2015. – № 4. – С. 51–55.
13. Green, M. R. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 4th ed. / M. R. Green, J. Sambrook. – New York, 2012. – 630 p.
14. Quan, J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways / J. Quan, J. Tian // *PLoS ONE*. – 2009. – Vol. 4, N 7. – Art. e6441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441>
15. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications / A. Bhatwa [et al.] // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2021. – Vol. 9. – Art. 630551. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630551>

## References

1. Yin W., Cai X., Ma H., Zhu L., Zhang Y., Chou S.-H., Galperin M. Y., He J. A decade of research on the second messenger c-di-AMP. *FEMS Microbiology Reviews*, 2020, vol. 44, no. 6, pp. 701–724. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa019>
2. Sanchez M. V., Ebensen T., Schulze K., Cargnelutti D., Blazejewska P., Scodeller E. A., Guzmán C. A. Intranasal delivery of influenza rNP adjuvanted with c-di-AMP induces strong humoral and cellular immune responses and provides protection against virus challenge. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 8, art. e104824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104824>
3. Lirussi D., Weissmann S. F., Ebensen T., Nitsche-Gloy U., Franz H. B. G., Guzman C. A. Cyclic di-adenosine monophosphate: a promising adjuvant candidate for the development of neonatal vaccines. *Pharmaceutics*, 2021, vol. 13, no. 2, art. 188. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020188>
4. Yan H., Chen W. The promise and challenges of cyclic dinucleotides as molecular adjuvants for vaccine development. *Vaccines*, 2021, vol. 9, no. 8, art. 917. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080917>
5. Wang C., Hao M., Qi Q., Chen Y., Hartig J. S. Chemical synthesis, purification, and characterization of 3'-5'-linked canonical cyclic dinucleotides (CDNs). *Methods in Enzymology*, 2019, vol. 625, pp. 41–59. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.04.022>
6. Villaverde A., Carrio M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: Biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters*, 2003, vol. 25, no. 17, pp. 1385–1395. <https://doi.org/10.1023/a:1025024104862>
7. Schramm F. D., Schroeder K., Jonas K. Protein aggregation in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2020, vol. 44, no. 1, pp. 54–72. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz026>
8. Shchokolova A. S., Rymko A. N., Kvach S. V., Shabunya P. S., Fatykhava S. A., Zinchenko A. I. Enzymatic synthesis of 2'-ara and 2'-deoxy analogues of c-di-GMP. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2015, vol. 34, no. 6, pp. 416–423. <https://doi.org/10.1080/15257770.2015.1006775>
9. Kamel S., Walczak M. C., Kaspar F., Westarp S., Neubauer P., Kurreck A. Thermostable adenosine 5'-monophosphate phosphorylase from *Thermococcus kodakarensis* forms catalytically active inclusion bodies. *Scientific Reports*, 2021, vol. 11, no. 1, art. 16880. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96073-5>
10. Singh A. K., Praharaaj M., Lombardo K. A., Yoshida T., Matoso A., Baras A. S., Zhao L., Srikrishna G., Huang J., Prasad P., Powell J. D., Kates M., McConkey D., Pardoll D. M., Bishai W. R., Bivalacqua T. J. Re-engineered BCG overexpressing cyclic di-AMP augments trained immunity and exhibits improved efficacy against bladder cancer. *Nature Communications*, 2022, vol. 13, no. 1, art. 878. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28509-z>
11. Mehne F. M., Gunka K., Eilers H., Herzberg C., Kaever V., Stülke J. Cyclic di-AMP homeostasis in *Bacillus subtilis*: both lack and high level accumulation of the nucleotide are detrimental for cell growth. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, vol. 288, no. 3, pp. 2004–2017. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.395491>
12. Kazlovskij I. S., Radevich D. S., Rymko A. N., Shchokolova A. S., Kvach S. V., Zinchenko A. I. Construction of *Escherichia coli* strain, producing di-adenylate cyclase and its application for cyclic di-AMP synthesis. *Vestsi Natsy-anal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya byalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2015, no. 4, pp. 51–55 (in Russian).
13. Green M. R., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual, fourth ed.* New York, 2012. 630 p.
14. Quan J., Tian J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PLoS ONE*, 2009, vol. 4, no. 7, art. e6441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441>
15. Bhatwa A., Wang W., Hassan Y. I., Abraham N., Li X.-Z., Zhou T. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, vol. 9, art. 630551. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630551>

**Информация об авторах**

*Винтер Маргарита Андреевна* – мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: rita.vinter.abc@gmail.com.

*Казловский Илья Сергеевич* – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kazlouski.illia@gmail.com.

*Зинченко Анатолий Иванович* – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by. ORCID: 0000-0003-2401-2586.

**Information about the authors**

*Vinter Margarita A.* – Junior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rita.vinter.abc@gmail.com.

*Kazlouski Illia S.* – Ph. D. (Biology), Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kazlouski.illia@gmail.com.

*Zinchenko Anatoliy I.* – Corresponding Member, D. Sc. (Biology), 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. ORCID: 0000-0003-2401-2586.