



УДК 577.112.083

## ГИБРИДНЫЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ 10-го ДОМЕНА ФИБРОНЕКТИНА ЧЕЛОВЕКА

© 2014 г. Л. Е. Петровская<sup>\*,#</sup>, С. Ш. Гапизов<sup>\*,\*\*</sup>, Л. Н. Шингарова<sup>\*</sup>, Е. А. Крюкова<sup>\*</sup>,  
Е. Ф. Болдырева<sup>\*</sup>, С. А. Якимов<sup>\*</sup>, Е. В. Свирщевская<sup>\*</sup>, Е. П. Лукашев<sup>\*\*</sup>,  
Д. А. Долгих<sup>\*,\*\*</sup>, М. П. Кирпичников<sup>\*,\*\*</sup>

<sup>\*</sup>ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>\*\*</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва  
Поступила в редакцию 25.11.2013 г. Принята к печати 24.12.2013 г.

В работе представлен новый тип гибридных молекул, включающих красный флуоресцентный белок mCherry и 10-й домен фибронектина человека типа III (<sup>10</sup>Fn3) — один из альтернативных каркасных белков, на основе которого могут быть получены рекомбинантные аналоги антител различной специфичности. Сконструированы различные варианты гена, кодирующего гибридный флуоресцентный белок, и изучена их экспрессия в клетках *Escherichia coli*. Установлено, что расположение mCherry на N-конце гибридного белка и предложенная нами модификация его N-концевой аминокислотной последовательности способствуют увеличению выхода продукта экспрессии в растворимой форме. На основе предложенной конструкции получен гибридный флуоресцентный белок ChIBF, содержащий αVβ3-интегринсвязывающий вариант <sup>10</sup>Fn3, и продемонстрирована возможность его использования для визуализации αVβ3-интегрин на поверхности эпителиальных клеток MDCK методом конфокальной микроскопии.

**Ключевые слова:** 10-й домен фибронектина типа III, mCherry, интегрин αVβ3, конфокальная микроскопия.

DOI: 10.7868/S0132342314030129

### ВВЕДЕНИЕ

Использование флуоресцентных белков в молекулярной и клеточной биологии является революционным подходом, позволяющим непосредственно наблюдать процессы, происходящие с участием отдельных молекул [1, 2]. Наиболее популярными областями их применения являются визуализация временной и пространственной локализации белков, а также их взаимодействий *in vivo*. С этой целью проводят конструирование и экспрессию гибридных генов, кодирующих какой-либо из известных флуоресцентных белков и целевой полипептид, под контролем необходимых регуляторных элементов. В большинстве случаев продукт экспрессии, приобретая флуоресцентные свойства, сохраняет специфические функциональные характеристики и локализацию [1].

Сокращения: <sup>10</sup>Fn3 — 10-й домен фибронектина человека типа III, FITC — изотиоцианат флуоресцеина; IPTG — изопропил-β-D-тиогаляктопиранозид, GFP — зеленый флуоресцентный белок, sfGFP — суперфолдирующийся GFP, mRFP — мономерный красный флуоресцентный белок, mEGFP — мономерный усиленный зеленый флуоресцентный белок.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел./факс: +7 (495) 330-69-83; эл. почта: lpetr65@yahoo.com).

Альтернативным инструментом для детекции и визуализации являются гибридные белки, в состав которых входят флуоресцентный белок и полипептид, обеспечивающий связывание с целевой молекулой. В зависимости от поставленной задачи, эта часть гибрида может представлять собой рекомбинантное антитело или его фрагмент [3–9], а также белок *A Staphylococcus aureus* [10]. Такие молекулы могут быть использованы в качестве реагентов для проведения различных исследований *in vitro*, включая иммунофлуоресцентный анализ (аналог ELISA), конфокальную микроскопию, флуоресцентно-активированный клеточный сортинг и другие методы. Их основным преимуществом является простота и быстрота анализа, который может быть проведен в одну стадию, а также низкая стоимость производства белка с помощью бактериальной экспрессии.

Несмотря на кажущуюся простоту и удобство конструирования гибридов связывающих и флуоресцентных белков, известно не так много примеров подобных работ. Так, в работах [4–6] описано получение гибридных белков, состоящих из одноцепочечного антитела и GFP, путем экспрессии в периплазме бактериальных клеток, однако

уровень их синтеза был крайне низким. При экспрессии в цитоплазме *Escherichia coli* большая часть гибридного белка обнаруживалась в составе нерастворимых тел включения [7]. Использование штаммов, обеспечивающих замыкание дисульфидных связей в цитоплазме клеток, привело к увеличению выхода белка в растворимой форме, однако доля активных гибридных молекул осталась невысокой [8].

В работе [9] описано получение полноразмерных молекул IgG, объединенных с “суперфолдирующимся” GFP (sfGFP). Различные варианты гибридных белков содержали от 2 до 8 молекул sfGFP, что способствовало усилению флуоресцентного сигнала. При внутриклеточной экспрессии в *E. coli* продукты экспрессии образовывали тела включения, однако использование разработанной авторами технологии ренатурации позволило добиться выхода около 50 мг активного гибридного белка из 1 л культуры. В настоящее время трудно прогнозировать, насколько описанный подход окажется эффективным для экспрессии аналогичных гибридов с другими антителами.

Предположительно, основным препятствием на пути получения гибридов связывающих и флуоресцентных белков является различие условий, обеспечивающих их правильный фолдинг. Сворачивание флуоресцентных белков и созревание хромофора требует восстанавливающих условий [11], в то время как для замыкания дисульфидных связей, присутствующих в молекулах антител и их аналогов, необходима окислительная среда [12].

В последнее время перспективным направлением в инженерии связывающих молекул является конструирование искусственных аналогов антител на основе альтернативных каркасных белков. Такие белки отличаются высокой стабильностью и небольшим размером, который обеспечивает более эффективное проникновение в ткани и позволяет использовать их в качестве партнеров в составе гибридных молекул [13]. Одним из наиболее популярных каркасных белков является 10-й домен фибронектина типа III ( $^{10}\text{Fn3}$ ), который обладает небольшим размером (10 кДа), высокой термостабильностью и хорошей растворимостью [14]. Отсутствие остатков цистеина обеспечивает возможность его эффективной экспрессии в цитоплазме бактериальных клеток, что может быть использовано для конструирования гибридных флуоресцентных белков.

Целью нашей работы явилось конструирование гибридного гена, кодирующего  $^{10}\text{Fn3}$  и красный флуоресцентный белок mCherry, изучение и оптимизация его экспрессии в клетках *E. coli* для обеспечения высокого уровня синтеза белка в цитоплазме клеток бактерий преимущественно в растворимой форме, а также получение на основе

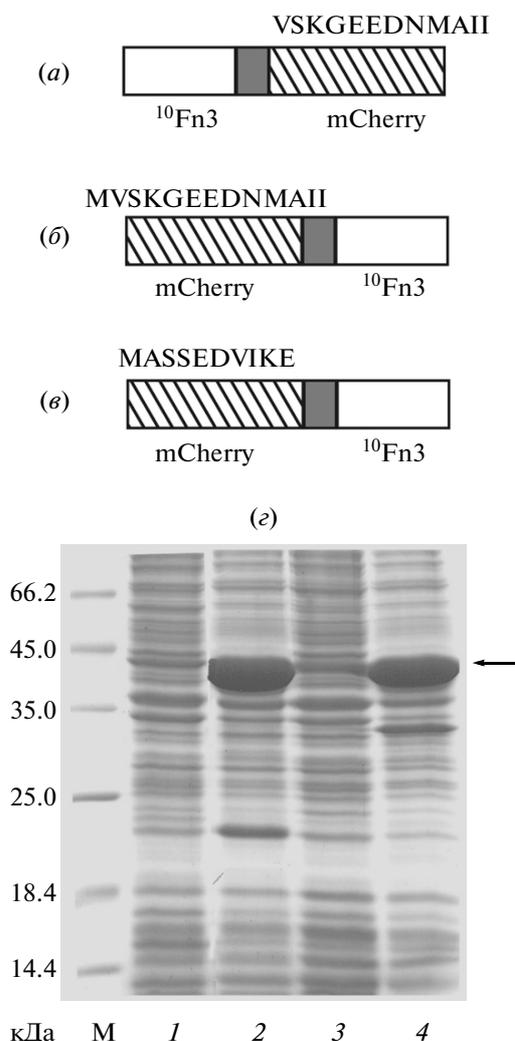
предложенной конструкции гибридного флуоресцентного белка ChIBF, содержащего  $\alpha\text{V}\beta 3$ -интегринсвязывающий вариант  $^{10}\text{Fn3}$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее известным и хорошо изученным флуоресцентным белком является зеленый флуоресцентный белок GFP, выделенный из медузы *Aequorea victoria*, и его усовершенствованные варианты [1]. Однако известно, что экспрессия GFP и содержащих его гибридных белков в клетках *E. coli* зачастую сопровождается образованием нерастворимых агрегатов [7, 15]. Кроме того, реагенты, максимум флуоресценции которых лежит в красной области, обладают рядом преимуществ, включая низкий уровень собственной флуоресценции клеток в этой области, более высокую проницаемость тканей для красного света и хорошую совместимость с лазерной техникой для конфокальной спектроскопии. Поэтому мы остановили свой выбор на красном флуоресцентном белке mCherry, который был получен на основе белка DsRed из кораллов рода *Discosoma* [16]. mCherry представляет собой мономерный белок с максимумом флуоресценции 610 нм, быстрым созреванием и высокой фотостабильностью. Отсутствие способности к димеризации также является преимуществом mCherry, поскольку снижает вероятность агрегации и негативного влияния на функции белка-партнера [1].

Ранее нами был сконструирован искусственный ген  $^{10}\text{Fn3}$ , оптимизированный для бактериальной экспрессии [17]. Для объединения генов mCherry и  $^{10}\text{Fn3}$  в единой рамке считывания было проведено их совместное клонирование в вектор для экспрессии на основе pET32a под контролем сильного регулируемого промотора *T7lac*. Для обеспечения независимого сворачивания белковых партнеров между кодирующими их генами была добавлена последовательность, кодирующая глицил-сериновый линкер. На 3'-конце полученного гибридного гена расположена последовательность, кодирующая гексагистидиновый фрагмент, для последующей очистки при помощи металлоаффинной хроматографии.

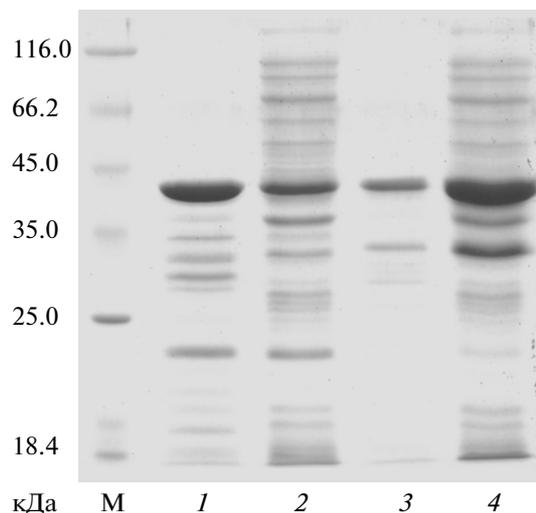
На первом этапе работы мы сконструировали ген гибридного белка Fn3Ch, на N-конце которого должен располагаться полипептид  $^{10}\text{Fn3}$ , а на C-конце – mCherry (рис. 1а). Методом белкового электрофореза установлено, что в результате экспрессии этого гена в клетках штамма BL21(DE3) происходит эффективный (до 20% общего клеточного белка) синтез полноразмерного гибридного белка Fn3Ch с подвижностью, соответствующей молекулярной массе 40 кДа (рис. 1г, дорожка 2). Электрофорез алиquot супернатанта и осадка, полученных после обработки биомассы



**Рис. 1.** Экспрессия генов гибридных флуоресцентных белков в клетках *E. coli*. *a* – Схематическое изображение гибридных белков Fn3Ch (*a*), NCherry (*b*), ChFn3 (*c*) с указанием *N*-концевых аминокислотных последовательностей mCherry. Белым цветом обозначен <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3, серым – глицил-сериновый линкер, штриховкой – mCherry. *d* – Гель-электрофорез в 13% ПААГ по Лэмбли суммарного клеточного белка штамма BL21(DE3) без плазмиды (1) или трансформированного плазмидами pFn3Ch (2), pNCherry (3), pChFn3 (4), после индукции IPTG. *M* – стандарты молекулярной массы белков (Fermentas).

клеток штамма-продуцента ультразвуком и центрифугирования, показал, что большая часть продукта экспрессии находится во фракции нерастворимых клеточных белков – телец включения (рис. 2). Известно, что как <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3, так и mCherry являются хорошо растворимыми белками, поэтому данный результат может объясняться нарушением процесса сворачивания белковых партнеров в составе гибрида.

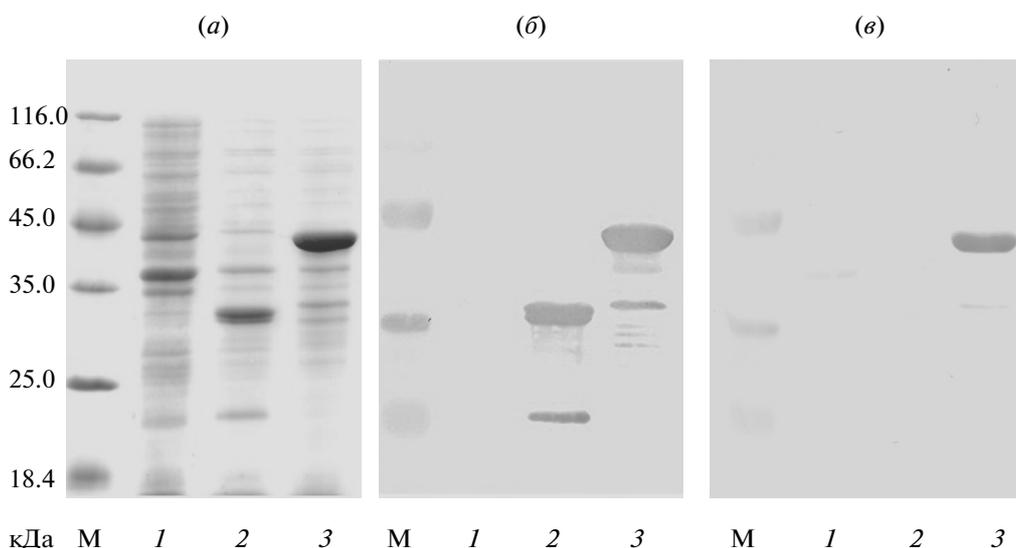
С целью повышения растворимости гибридного флуоресцентного белка было принято решение



**Рис. 2.** Изучение растворимости гибридных флуоресцентных белков в клетках *E. coli*. Гель-электрофорез в 13% ПААГ по Лэмбли образцов фракций нерастворимых (1, 3) и растворимых (2, 4) белков клеток штамма BL21(DE3), трансформированного плазмидами pFn3Ch (1, 2) и pChFn3 (3, 4). *M* – стандарты молекулярной массы белков. Стрелкой указано положение гибридного белка.

поменять местами составляющие его белки-партнеры. Вначале нами был получен ген гибридного белка NCherry, на *N*-конце которого находится mCherry, а на *C*-конце – <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 (рис. 1б). Однако оказалось, что уровень синтеза такого гибридного белка в клетках *E. coli* крайне низок (рис. 1г, дорожка 3).

Невысокий уровень бактериальной экспрессии генов во многих случаях объясняется пониженной эффективностью процесса инициации трансляции мРНК, которая, в свою очередь, определяется доступностью иницирующего кодона и участка связывания рибосом. Стабильная вторичная структура этого участка мРНК может затруднять инициацию и снижать выход целевого белка [18]. Мы предположили, что оптимизация 5'-концевой последовательности гена *mCherry* обеспечит более эффективную инициацию трансляции соответствующей мРНК. С этой целью была проведена замена участка гена, кодирующего *N*-концевую аминокислотную последовательность mCherry, фрагментом ДНК, кодирующим первые шесть аминокислотных остатков mRFP [19]. Предварительный анализ возможных вариантов вторичной структуры мРНК вблизи иницирующего кодона, проведенный с помощью программы mfold (<http://mfold.rna.albany.edu>), показал, что в модифицированной последовательности вероятность образования стабильных элементов вторичной структуры, включающих регуляторные участки, существенно ниже (данные не приведены). В



**Рис. 3.** Анализ лизатов клеток штамма BL21(DE3) без плазмиды (1), продуцирующего белки mCherry (2) и ChFn3 (3) с помощью гель-электрофореза (а) и Вестерн-блота с антителами к His<sub>6</sub>-последовательности (б) и <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 (в). М – стандарты молекулярной массы белков.

результате был получен ген гибридного белка ChFn3 (рис. 1в).

Анализ экспрессии гибридного гена, содержащегося в плазмиде рChFn3, продемонстрировал, что данная конструкция обеспечивает более эффективный синтез рекомбинантного белка в клетках штамма BL21(DE3), чем рNCherry (рис. 1г, дорожка 4). После индукции уровень синтеза достигает 20% общего клеточного белка, при этом большая часть продукта экспрессии находится в растворимой форме (рис. 2, дорожки 3, 4). В результате сравнения интенсивности флуоресценции осветленных лизатов бактериальных культур, экспрессирующих полученные гибридные гены, мы установили, что уровень флуоресценции, обеспечиваемый в результате экспрессии гена *ChFn3*, превышает уровень флуоресценции лизатов клеток, содержащих белок Fn3Ch, в 4.3 раза (данные не приведены). На основании полученных данных можно предположить, что расположение mCherry на N-конце гибридного белка способствует повышению его растворимости в клетках бактерий.

Для подтверждения строения гибридного белка мы провели анализ лизата культуры клеток *E. coli*, продуцирующих ChFn3, с помощью Вестерн-блота. В качестве контроля использовали лизат штамма-продуцента mCherry, полученного нами ранее (неопубликованные данные), а также клеток, не содержащих плазмиду. Установлено, что оба рекомбинантных белка, содержащих гексагистидиновую последовательность, окрашиваются соответствующими антителами (рис. 3б, дорожки 2, 3), в то время как взаимодействие с антителами к <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 обнаруживает только ChFn3 (рис. 3в,

дорожки 2, 3). Таким образом, в результате проведенной оптимизации нам удалось сконструировать высокоэффективный продуцент гибридного белка ChFn3, включающего mCherry и <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3.

С помощью металлоаффинной хроматографии на Ni-NTA-сефарозе рекомбинантный белок ChFn3 был получен в очищенном виде для более детального исследования его свойств. При анализе очищенного препарата с помощью белкового электрофореза было установлено, что он представлен двумя полосами с подвижностями, соответствующими 40 и 33 кДа, нижняя из которых предположительно образуется в результате расщепления гибридного белка по остатку Met65 в процессе пробоподготовки и электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия [20]. Соответствующие полосы обнаруживаются также при анализе лизатов штаммов-продуцентов ChFn3 и mCherry методом Вестерн-блота (рис. 3б, дорожки 2, 3).

Известно, что в ряде работ отмечалось наличие растворимых высокомолекулярных агрегатов в составе очищенных гибридных белков, содержащих GFP [5, 21]. Для подтверждения монодисперсности белка ChFn3 и отсутствия в препарате продуктов протеолитической деградации мы провели его исследование при помощи аналитической гель-фильтрации на предварительно откалиброванной колонке Superdex 200 (рис. 4). В качестве контроля использовали ранее полученный препарат mCherry. Время выхода обоих белков с колонки соответствовало мономерной форме препаратов (29 мин для mCherry, 26 мин для ChFn3).

Анализ спектров возбуждения и эмиссии флуоресценции рекомбинантного ChFn3 продемон-

стрировал их полную идентичность с известными по литературным данным для mCherry [16] (максимум возбуждения 587 нм, максимум эмиссии 610 нм) (рис.5). Таким образом, мы установили, что гибридный белок, содержащий mCherry и <sup>10</sup>Fn3, синтезируется в бактериальных клетках в растворимом мономерном состоянии и демонстрирует спектр флуоресценции, характерный для mCherry, что свидетельствует о наличии правильной конформации. Известно, что mCherry обладает, по различным оценкам, в 2–4 раза более высокой скоростью сворачивания, чем GFP, а также менее гидрофобной поверхностью, что, вероятно, способствует эффективному фолдингу и повышению растворимости гибридного белка в клетках бактерий [16]. Его недостатком является невысокая яркость (47% от яркости mEGFP [16]). В последнее время был получен ряд новых флуоресцентных белков, обладающих высокой скоростью сворачивания и повышенной яркостью [22], которые в дальнейшем могут быть использованы в подобных гибридных молекулах с целью их усовершенствования.

Для демонстрации возможности применения гибридных флуоресцентных белков на основе <sup>10</sup>Fn3 с целью молекулярной визуализации мы сконструировали вариант этого белка, связывающий интегрин  $\alpha_V\beta_3$ . Интегрины – семейство гетеродимерных гликопротеинов, расположенных на клеточной поверхности и участвующих в межклеточной коммуникации [23].  $\alpha_V\beta_3$ -Интегрин играет ключевую роль в адгезии к белкам внеклеточного матрикса, а также инициирует сигналы, индуцирующие миграцию, пролиферацию и дифференцировку клеток эндотелия, моноцитов, фибробластов [24]. Он обладает способностью связываться с последовательностью Arg-Gly-Asp в составе <sup>10</sup>Fn3 [24], однако аффинность этого взаимодействия недостаточно высока для того, чтобы содержащий эту последовательность гибридный белок ChFn3 можно было использовать для визуализации  $\alpha_V\beta_3$ -интегрина на поверхности клеток.

В работе [25] описано получение на основе <sup>10</sup>Fn3 искусственного белка 3JCLI4, имеющего пять аминокислотных замен в составе петли FG и обладающего повышенной аффинностью по отношению к  $\alpha_V\beta_3$ -интегрину ( $K_d = 6.82 \times 10^{-9}$  М). С помощью олигонуклеотиднаправленного мутагенеза мы сконструировали соответствующий вариант гена *ChFn3* и осуществили его экспрессию в клетках *E. coli*, как описано для исходного гибридного белка. Уровень синтеза данного варианта гибридного белка – ChIBF – и его растворимость в клетках бактерий оказались такими же высокими, как и в случае ChFn3. При помощи металлоаффинной хроматографии рекомбинантный белок был получен в очищенном виде.

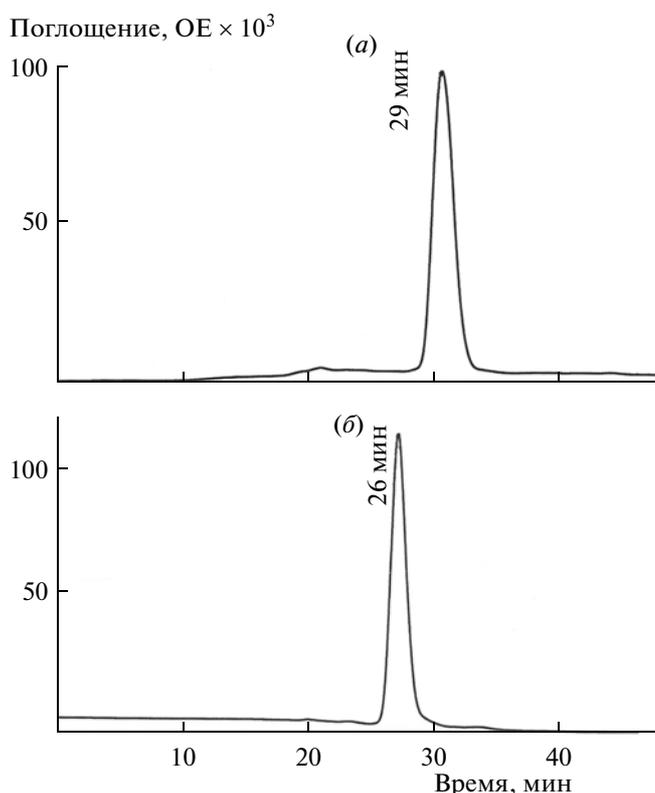


Рис. 4. Гель-фильтрация mCherry (a) и гибридного белка ChFn3 (б) на колонке Superdex 200.

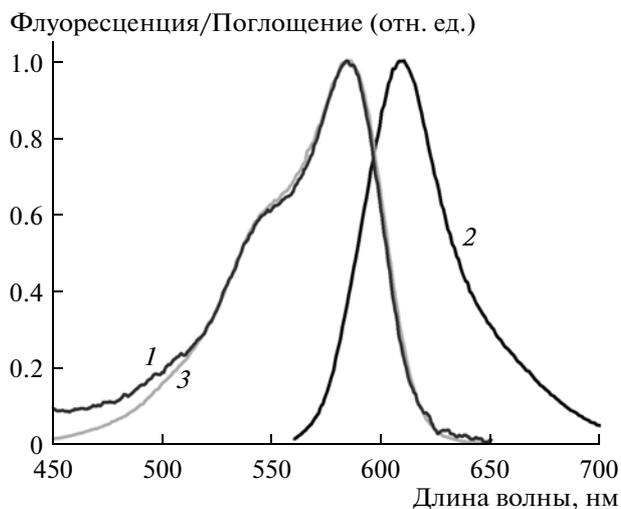
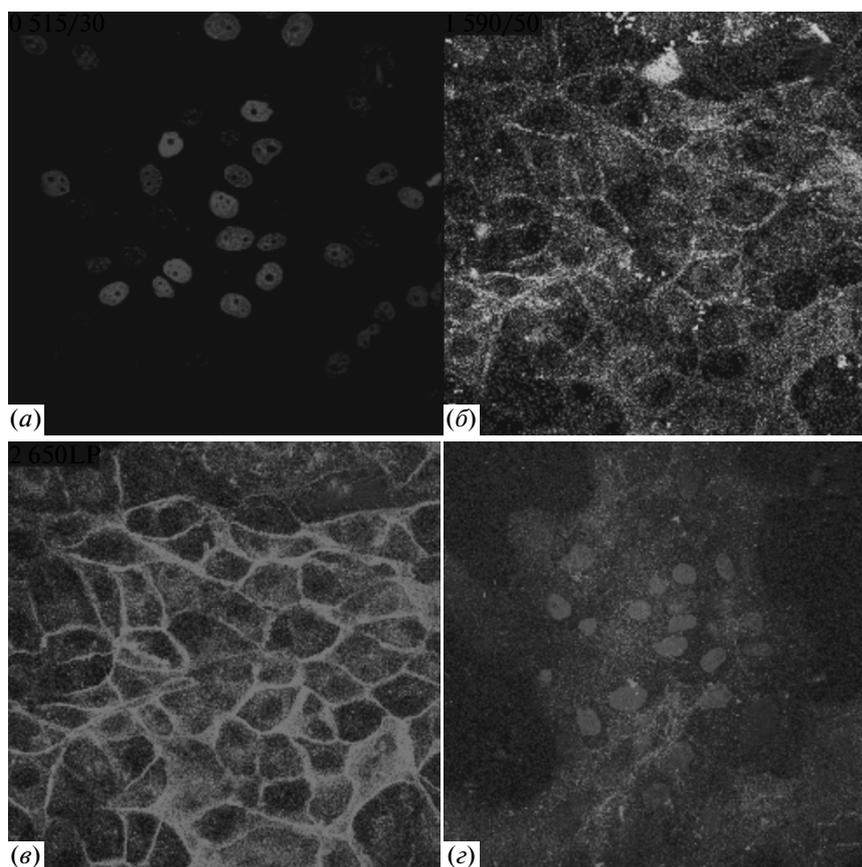


Рис. 5. Спектры эмиссии (1) и возбуждения (2) флуоресценции и спектр поглощения (3) гибридного белка ChFn3.

Связывающая активность гибридного белка ChIBF была исследована методом конфокальной микроскопии на клеточной линии MDCK (эпителий почки собаки). Известно, что клетки MDCK равномерно экспрессируют интегрины нескольких типов ( $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_3$ ) как на базальной, так



**Рис. 6.** Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток MDCK с помощью: *a* – красителя Hoechst 33342 (ядра клеток); *б* – FITC-меченных антител к  $\alpha_v\beta_3$ -интегрину (положительный контроль); *в* – белка ChIBF; *г* – белка ChFn3 (отрицательный контроль). Увеличение 600 $\times$ .

и на латеральной мембранах [26]. Экспонирование интегринов, а также других молекул клеточной адгезии на поверхности эпителиальных клеток обеспечивает их взаимодействие с соседними клетками и внеклеточным матриксом, результатом которого является характерная для них поляризация. Сигнальный каскад, инициируемый интегринами, может оказывать влияние на дифференцировку и пролиферацию этих клеток, а также участвовать в формировании ответа на воспаление, повреждение и другие процессы [27].

В результате инкубации гибридного флуоресцентного белка ChIBF с клетками линии MDCK с помощью конфокальной микроскопии было продемонстрировано равномерное окрашивание клеточной поверхности (рис. 6, панель *в*). Аналогичная картина наблюдалась при использовании моноклональных антител к  $\alpha_v\beta_3$ -интегрину (рис. 6, панель *б*). В обоих случаях экспрессия  $\alpha_v\beta_3$ -интегрина была обнаружена на базальной и латеральной мембранах клеток, что соответствует литературным данным [26]. Добавление белка ChFn3 сопровождалось слабым диффузным окрашиванием клеток,

предположительно вследствие низкоаффинного неспецифического связывания (рис. 6, панель *г*).

Необходимо отметить, что уровень продукция  $\alpha_v\beta_3$ -интегрина существенно повышается на поверхности активированных клеток, а также в случае различных патологических состояний [28]. Повышенное содержание данного интегрина, характерное для эндотелиальных клеток сосудистой системы опухолей, может способствовать метастазированию путем облегчения инвазии раковых клеток. Продемонстрирована важная роль  $\alpha_v\beta_3$ -интегрина в патогенезе ревматоидного артрита, атеросклероза и глазных заболеваний [28–32]. Вследствие этого  $\alpha_v\beta_3$ -интегрин является перспективным молекулярным маркером для диагностики указанных патологических процессов. Результаты нашей работы позволяют предположить, что полученный нами гибридный флуоресцентный белок ChIBF может быть использован в этих целях в качестве дешевой и эффективной замены специфических моноклональных антител. Разработанная нами система экспрессии обеспечивает высокий уровень синтеза рекомбинантного продукта в клетках *E. coli* и в дальнейшем может являться ос-

Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе

| Праймер    | Последовательность (5'–3')                       |
|------------|--|
| Bam-FN     | TATAAGGATCCGGTGGAGGTGGCTCTCTGGAAGTTGTTGCGGCGA    |
| FN-Xho     | ACATACTCGAGGGTACGGTAGTTGATAGAG                   |
| Fndim3     | TTATAGGATCCACCAGAACCACCTCCGCCGGTACGGTAGTTGATAGAG |
| Bam-Cherry | ATAAGGATCCGGTGGAGGTGGCTCTGTGAGCAAGGGCGAGGAG      |
| Nde_Ch     | TACTAACATATGGTGAGCAAGGGCGAG                      |
| Cherry-Xho | ACATCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATGC                   |
| Che_Bam2   | TTATAGGATCCACCAGACTTGTACAGCTCGTCCATG             |
| Nde_Ch2    | TACTAACATATGGCAAGTTCTGAAGATGTTATCAAAGAGTTCATGCGC |
| JCL4f      | CGTGGTGATTGGAACGAAGGCTCTAAACCGATCTCTATCAAC       |
| JCL4r      | CTTCGTTCCAATCACCACGTGGGGTAACCGCGTAAACGGTG        |

новой для получения аналогичных флуоресцентных белков, обладающих различной связывающей активностью.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы фирм “Bio-Rad” (США), “Sigma” (США), “Merck” (США), “Panreac” (Испания), компоненты сред для культивирования бактерий Difco (США). Растворы готовили на деионизованной воде MilliQ.

**Клонирование рекомбинантных ДНК** осуществляли стандартными методами в клетках *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene). Использовали ферменты производства “Fermentas” (Литва). Олигонуклеотиды синтезированы фирмой “Евроген” (Россия). Амплификацию генов с помощью ПЦР проводили с использованием *Pfu*-полимеразы в условиях, рекомендованных производителем фермента.

Для получения плазмиды рFn3Ch фрагмент ДНК, содержащий ген *<sup>10</sup>Fn3*, амплифицировали при помощи ПЦР на матрице плазмидной ДНК рЕТFN3 [17] с использованием праймеров T7prom и Fndim3 (таблица). Для амплификации гена *mCherry* использовали праймеры Bam-Cherry и Cherry-Xho, последовательности которых включали участки узнавания соответствующих рестриктаз, и плазмидную ДНК pmCherry-C1 (Clontech, США) в качестве матрицы. После обработки рестриктазами NdeI и BamHI в случае гена *<sup>10</sup>Fn3* и BamHI и XhoI в случае гена *mCherry* они были совместно клонированы в вектор, полученный путем обработки ДНК плазмиды рЕТ32a (Novagen, США) рестриктазами NdeI и XhoI. В результате была сконструирована плазида рFn3Ch, содержащая гены *<sup>10</sup>Fn3* и *mCherry* в единой рамке считывания.

Для конструирования плазмид рNCherry и рChFn3 ген *mCherry* амплифицировали с использованием праймеров Nde\_Ch или Nde\_Ch2 соответственно и Che\_Bam2, а ген *<sup>10</sup>Fn3* – с использованием праймеров Bam-FN и FN-Xho (таблица).

Полученные фрагменты обрабатывали рестриктазами NdeI и BamHI в случае гена *mCherry* и BamHI и XhoI в случае гена *<sup>10</sup>Fn3* и совместно клонировали в вектор на основе плазмиды рЕТ32a как описано выше.

Для получения фрагмента ДНК, содержащего ген *3JCL14* [25], проводили двустадийную ПЦР на матрице плазмидной ДНК рЕТFN3. На первом этапе были получены два фрагмента, один с использованием праймеров T7prom и JCL4r, а второй – с T7ter и JCLf (таблица). На втором этапе очищенные продукты первого раунда ПЦР объединили и провели второй раунд с праймерами T7prom и T7ter. Полученный ПЦР-продукт был обработан рестриктазами NdeI и XhoI и клонирован в вектор, полученный обработкой плазмидной ДНК рChFn3 рестриктазами NdeI и XhoI. В результате была сконструирована плазида рChIBF. Строение всех полученных плазмид подтверждали рестриктным анализом и секвенированием в пределах вставки (ЦКП “Геном”, Россия).

**Выделение белков.** Клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) (Novagen), трансформированные одной из полученных плазмид, выращивали в 200 мл среды LB с ампициллином (100 мкг/мл) при 37°C до  $A_{560}$  0.5–0.7 и индуцировали экспрессию рекомбинантных генов добавлением 0.2 мМ IPTG, после чего продолжали культивирование в течение 4 ч при 27°C. Для анализа уровня экспрессии методом белкового электрофореза из полученной культуры отбирали количество клеток, соответствующее 1 ОЕ<sub>560</sub>, центрифугировали 5000 об/мин в течение 5 мин и суспендировали в 100 мкл буфера для нанесения. На гель наносили 1/10 образца после прогрева при 95°C в течение 5 мин.

Биомассу после центрифугирования суспендировали в буфере А (50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 1 мМ фенолметилсульфонилфторида, 200 мМ NaCl) и разрушали клетки обработкой ультразвуком (Branson, США) на ледяной бане в течение 3 мин при 50% мощности. Для анализа растворимо-

сти отбирали аликвоту объемом 15 мкл, центрифугировали 5 мин при 13000 об/мин и по отдельности наносили на белковый форец супернатант и осадок. Затем после центрифугирования препарат наносили на колонку Ni-Sepharose FastFlow (GE Healthcare, США), уравновешенную буфером А с 10 мМ имидазолом, промывали буфером 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, содержащим 0.5 М NaCl, 20 мМ имидазол, и элюировали буфером 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, содержащим 200 мМ NaCl, 300 мМ имидазол. Собирали содержащие окрашенный целевой белок фракции и диализовали в течение ночи при 4°C против буфера 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 200 мМ NaCl.

Концентрацию белков рассчитывали с использованием индивидуальных молярных коэффициентов поглощения и измерения оптического поглощения при 280 нм.

Для сравнения флуоресценции осветленных клеточных лизатов из каждой индуцированной культуры отбирали количество клеток, соответствующее 2 ОЕ<sub>560</sub>, центрифугировали 5000 об/мин в течение 5 мин и обрабатывали ультразвуком как описано выше, после чего центрифугировали суспензию в течение 10 мин при 15000 об/мин. Измерение **спектров флуоресценции** осветленных лизатов и очищенного белка ChFn3 проводили на спектрофлуориметре Fluorolog 3 (Horiba Jobin Yvon, Япония), приобретенном в рамках Программы развития МГУ.

Для анализа при помощи **Вестерн-блота** разделенные гель-электрофорезом лизаты клеток BL21(DE3), а также штаммов-продуцентов mCherry и ChFn3 (по 0.1 ОЕ<sub>560</sub> в лунку) переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) по методу [33]. Окрашивание мембраны проводили с использованием конъюгата анти-His-HRP (Invitrogen, США) или моноклональных антител к <sup>10</sup>Fn3 (Hybridoma Laboratories, Россия) с последующей обработкой конъюгатом анти-мышь-HRP (Sigma, США) в соответствии с рекомендациями производителей. В качестве субстрата использовали преципитирующий однокомпонентный раствор ТМВ (GenWay Biotech, США).

**Аналитическую гель-фильтрацию** проводили на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) при скорости потока 0.4 мл/мин в буфере 100 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 150 мМ NaCl. Детекцию осуществляли путем измерения поглощения в УФ-области при длине волны 230 нм.

**Конфокальная микроскопия.** Для анализа взаимодействия полученных гибридных флуоресцентных белков с интегрином  $\alpha_v\beta_3$  использовали клеточную линию MDCK (эпителлий почки собаки, ATCC CCL-34). Клетки выращивали во флаконах (Nunc) на среде RPMI-1640 с 7% эмбриональной телячьей сывороткой и L-глутамином (ПанЭко, Москва). Для посева клетки снимали с подлож-

ки раствором EDTA-Трипсин (ПанЭко), 10<sup>5</sup> клеток заседали на стерильные покровные стекла, помещенные в лунки 6-луночного планшета в объеме 200 мкл полной культуральной среды. Клетки инкубировали 18–20 ч для формирования монослоя. В качестве положительного контроля добавляли меченные FITC моноклональные антитела к интегину  $\alpha_v\beta_3$  человека (eBioscience, США) в разведении 1 : 200. В опытные лунки добавляли белки ChIBF или ChFn3 (отрицательный контроль) в концентрации 0.5 мкМ. В каждую лунку также добавляли Hoechst 33342 (Sigma) для окрашивания ядер. Клетки инкубировали 1 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C и фиксировали при помощи 1% параформальдегида в течение 30 мин при 37°C, затем проводили отмывку буфером PBS, содержащим 0.1% BSA и 0.02% NaN<sub>3</sub>. Образцы фиксировали на предметном стекле при помощи Mowiol 4.88 (Calbiochem) и анализировали на конфокальном микроскопе Nikon Eclipse TE2000-E.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проводится при финансовой поддержке гранта РФФИ № 13-04-12405 офи\_м и программы РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A. // *Physiol. Rev.* 2010. V. 90. P. 1103–1163.
2. Giepmans B., Adams S., Ellisman M., Tsien R. // *Science.* 2006. V. 312. P. 217–224.
3. Desplancq D., Rinaldi A.S., Stoessel A., Sibling A.P., Busso D., Oulad-Abdelghani M., Van Regenmortel M.H., Weiss E. // *J. Immunol. Methods.* 2011. V. 369. P. 42–50.
4. Sakamoto S., Taura F., Pongkitwittoon B., Putalun W., Tsuchihashi R., Kinjo J., Tanaka H., Morimoto S. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 356. P. 2955–2963.
5. Casey J.L., Coley A.M., Tilley L.M., Foley M. // *Protein Eng.* 2000. V. 13. P. 445–452.
6. Griep R.A., van Twisk C., van der Wolf J.M., Schots A. // *J. Immunol. Methods.* 1999. V. 230. P. 121–130.
7. Oelschlaeger P., Srikant-Iyer S., Lange S., Schmitt J., Schmid R.D. // *Anal. Biochem.* 2002. V. 309. P. 27–34.
8. Schwalbach G., Sibling A.P., Choulier L., Deryckure F., Weiss E. // *Protein Expr. Purif.* 2000. V. 18. P. 121–132.
9. Luria Y., Raichlin D., Benhar I. // *MAbs.* 2012. V. 4. P. 373–384.
10. Aoki T., Takahashi Y., Koch K.S., Leffert H.L., Watabe H. // *FEBS Lett.* 1996. V. 384. P. 193–197.
11. Feilmeier B.J., Iseminger G., Schroeder D., Webber H., Phillips G.J. // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. P. 4068–4076.
12. Skerra A., Pluckthun A. // *Science.* 1988. V. 240. P. 1038–1041.
13. Skerra A. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. V. 18. P. 295–304.
14. Koide A., Bailey C.W., Huang X., Koide S. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 284. P. 1141–1151.

15. Chang H.C., Kaiser C.M., Hartl F.U., Barral J.M. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 353. P. 397–409.
16. Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Gierpmans B.N.G., Palmer A.E., Tsien R.Y. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 1567–1572.
17. Петровская Л.Е., Шингарова Л.Н., Крюкова Е.А., Болдырева Е.Ф., Якимов С.А., Гурьянова С.В., Новоселецкий В.Н., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. // *Биохимия*. 2012. Т. 77. С. 79–89.
18. de Smiy M., van Duin J. // *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 1990. V. 38. P. 1–35.
19. Campbell R.E., Tour O., Palmer A.E., Steinbach P.A., Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002. V. 99. P. 7877–7882.
20. Gross L.A., Baird G.S., Hoffman R.S., Baldrige K.K., Tsien R.Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000. V. 97. P. 11990–11995.
21. Cha H.J., Wu C.F., Valdes J.J., Rao G., Bentley W.E. // *Biotechnol. and Bioeng.* 2000. V. 67. P. 565–574.
22. Shcherbo D., Murphy C.S., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Chepurnykh T.V., Shcheglov A.S., Verkhusha V.V., Pletnev V.Z., Hazelwood K.L., Roche P.M., Lukyanov S., Zaraisky A.G., Davidson M.W., Chudakov D.M. // *Biochem J.* 2009. V. 418. P. 567–574.
23. Cox D., Brennan M., Moran N. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010. V. 9. P. 804.
24. Liu Z., Wang F., Chen X. // *Drug Dev. Res.* 2008. V. 69. P. 329.
25. Richards J., Miller M., Abend J., Koide A., Koide S., Dewhurst S. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 326. P. 1475–1488.
26. Schoenenberger C.A., Zuk A., Zinkl G.M., Kendall D., Matlin K.S. // *J. Cell Sci.* 1994. V. 107. P. 527–541.
27. Sheppard D. // *BioEssays*. 1996. V. 18. P. 655–660.
28. Laitinen I., Saraste A., Weidl E., Poethko T., Weber A.W., Nekolla S.G., Leppänen P., Ylä-Herttuala S., Hölzlwimmer G., Walch A., Esposito I., Wester H.J., Knuuti J., Schwaiger M. // *Circ. Cardiovasc. Imaging*. 2009. V. 2. P. 331.
29. Desgrosellier J., Cheresh D.A. // *Nat. Rev. Cancer*. 2010. V. 10. P. 9.
30. Liu Z., Wang F., Chen X. // *Drug Dev. Res.* 2008. V. 69. P. 329.
31. Avraamides C., Garmy-Susini B., Varner J. // *Nat. Rev. Cancer*. 2008. V. 8. P. 604.
32. Eliceiri B.P., Cheresh D.A. // *J. Clin. Invest.* 1999. V. 103. P. 1227.
33. Towbin H., Strahelin T., Gordon J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1979. V. 76. P. 4350–4354.

## Fluorescent Fusion Proteins with 10th Human Fibronectin Domain

L. E. Petrovskaya\*, #, S. Sh. Gapizov\*, \*\*, L. N. Shingarova\*, E. A. Kryukova\*,  
E. F. Boldyreva\*, S. A. Yakimov\*, E. V. Svirshevskaya\*, E. P. Lukashev\*\*,  
D. A. Dolgikh\*, \*\*, M. P. Kirpichnikov\*, \*\*

# e-mail: lpetr65@yahoo.com

\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\* Lomonosov Moscow State University, Biological Department

In the current paper we describe a new type of hybrid molecules including red fluorescent protein mCherry and 10th type III human fibronectin domain (<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3) – one of the alternative scaffold proteins which can be used for the construction of antibody mimics with various binding specificity. We have constructed different gene variants encoding for the hybrid fluorescent protein and studied their expression in *Escherichia coli* cells. It was shown that N-terminal position of mCherry and modification of its N-terminal amino acid sequence promotes efficient bacterial expression of the hybrid protein in the soluble form. On the basis of the proposed construction we have obtained the hybrid fluorescent protein ChIBF, containing α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>-integrin binding variant of <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3, and demonstrated the possibility of its utilization for the visualization of α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>-integrin at the surface of MDCK epithelial cells by confocal microscopy.

*Keywords:* 10th type III human fibronectin domain, mCherry, integrin α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>, epithelial cells, confocal microscopy