



УДК 579.871.1'112.016:616.9

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА

© 2014 г. А. Ю. Лабынцев^{*,#}, Н. В. Короткевич^{*}, К. Ю. Манойлов^{*},
А. А. Кабернюк^{**}, Д. В. Колибо^{*}, С. В. Комисаренко^{*}

^{*}Институт биохимии им. А.В. Палладина Национальной академии наук Украины,
ул. Леонтовича, 9, Киев, 01601, Украина

^{**}Albert Einstein College of Yeshiva University, 1300 Morris Park Avenue Bronx, NY 10461, USA

Поступила в редакцию 27.12.2013 г. Принята в печать 25.02.2014 г.

Дифтерийный токсин (ДТ) является основным фактором патогенности возбудителя дифтерии *Corynebacterium diphtheriae*. Благодаря небольшому размеру токсин представляет значительный интерес для создания искусственных белковых молекул с транспортирующей функцией, например, иммунотоксинов. В работе описана экспрессия и характеристика нетоксичных рекомбинантных флуоресцентных производных ДТ и его нетоксичной мутантной формы CRM197. Полученные белки могут использоваться для исследований рецепторсвязывающей и транспортной функций ДТ в клетках и уровня экспрессии рецептора токсина proHB-EGF на мембранах, для иммунизации и получения специфичных к токсину антител, а также при разработке диагностических тест-систем для определения ДТ и специфичных антител.

Ключевые слова: рекомбинантные нетоксичные аналоги бактериальных токсинов, флуоресцентные белки, молекулярное клонирование, proHB-EGF.

DOI: 10.7868/S0132342314040083

ВВЕДЕНИЕ

Дифтерийный токсин – представитель бактериальных белковых экзотоксинов, обладающий чрезвычайно высокой токсичностью. Он является основным фактором патогенности бактерии *Corynebacterium diphtheriae*. Токсин синтезируется бактерией лишь после лизогенизации генома *C. diphtheriae* коринефагом β, несущим ген функционально активного токсина [1]. ДТ синтезируется в виде одной полипептидной цепи, имеющей в своей структуре два дисульфидных мостика. Токсин массой 58.36 кДа представляет собой профермент, который после протеолитического расщепления образует две части: ферментативную часть – субъединицу А (SbA) и транспортную часть – субъединицу В (SbB) [2, 3]. Молекула токсина состоит из трех доменов: ката-

литического – С-домена, который соответствует SbA, транспортного – Т-домена и рецепторсвязывающего – R-домена (Rd); последние два образуют SbB [3, 4]. R- и Т-домены участвуют в транспорте каталитического домена в цитозоль клетки, и, соответственно, токсических свойств не проявляют, а С-домен отвечает за цитотоксическую активность токсина.

Рецептором ДТ на поверхности клеток выступает мембраносвязанная молекула proHB-EGF (от англ. “progenitor of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor”) [5], с которой взаимодействует Rd [6]. Связывание ДТ запускает процесс клатринзависимого эндоцитоза комплекса токсин–рецептор внутрь клеток в составе эндосом. В процессе эндоцитоза происходит протеолитическое расщепление токсина (процессинг), после которого SbA и SbB остаются соединенными только дисульфидным мостиком [7]. Понижение эндосомального pH приводит к конформационным изменениям в структуре Т-домена, который приобретает липофильные свойства и способность проникать через мембрану эндосомы [8]. С-домен после транслокации в цитозоль отсоединяется от Т-домена вследствие восстановления дисульфидной связи присутствующим в цитозоле глутатионом. В дальнейшем С-домен

[#] Сокращения: ДТ – дифтерийный токсин; BSA – бычий сывороточный альбумин; DABCO – 1,4-диазобициклооктан; IPTG – изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид; LD – летальная доза; PBS – физиологический фосфатный раствор; proHB-EGF – предшественник гепаринсвязывающего фактора роста клеток, подобного эпидермальному фактору роста; PVA – поливиниловый спирт; Rd – R-домен ДТ; SbA и SbB – А и В-субъединицы ДТ; SOE-PCR – ПЦР с использованием сплайсинга через перекрывающиеся концы.

[#] Автор для переписки (тел.: +380-(44) 234-33-54; эл. почта: lab.andrey@gmail.com).

способен ADP-рибозилировать внутриклеточную мишень – эукариотический фактор элонгации eEF-2 по особому аминокислотному остатку – дифтамиду, являющемуся посттрансляционной модификацией гистидина. Такая модификация eEF-2 обуславливает остановку биосинтеза белков в клетке, что приводит к ее гибели. Более подробно схема действия токсина описана в обзоре [9].

Полулетальная доза LD₅₀ ДТ для человека составляет менее 100 нг на кг массы тела [10], что характеризует его как высокотоксичный белок. Согласно Статье I.1 “Конвенции о запрещении разработки, производства и накопления запасов бактериологического (биологического) и токсинного оружия и об их уничтожении”: “Каждое государство – участник настоящей Конвенции обязуется никогда, ни при каких обстоятельствах не разрабатывать, не производить, не накапливать, не приобретать каким-либо иным образом и не сохранять: микробиологические или другие биологические агенты, или токсины...” [11]. Настоящая Конвенция, создавая условия для более безопасных исследований и уменьшения рисков двойного использования результатов исследований (как для мирных целей, так и для военных нужд), значительно усложняет изучение бактериальных токсинов. Преодолению данной ситуации посвящена вторая часть Статьи I.1 Конвенции, согласно которой существует возможность проведения работ с микробиологическими или другими биологическими агентами, или токсинами, если они “предназначены для профилактических, защитных или других мирных целей”. В случае ДТ это означает возможность использования иммунотоксинов на его основе, в которых R-домен заменен на лиганд для рецепторов с высокой экспрессией на опухолевых клетках.

Так, например, в работах [12, 13] для исследований функциональной активности ДТ был получен его аналог, включающий вместо R-домена интерлейкин-2 (DAB389IL-2), однако его взаимодействие с рецептором proHB-EGF может отличаться от действия нативного токсина. Ранее нами предложена альтернативная конструкция для исследования рецепторсвязывающей и транспортной функции ДТ – нетоксичный аналог EGFP-SbB, который имеет в своем составе R- и T-домены ДТ, а также содержит зеленый флуоресцентный белок EGFP вместо цитотоксичного C-домена [14].

Цель данной работы – получение рекомбинантных мутантных форм и флуоресцентных аналогов ДТ, которые были бы пригодны для исследования его рецепторсвязывающей и транспортной функции при отсутствии токсических свойств.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате работы получены нетоксичные рекомбинантные аналоги ДТ, а именно: флуоресцентные производные на основе зеленого флуоресцентного белка EGFP – EGFP-Rd, красного флуоресцентного белка mCherry – mCh-Rd и mCh-SbB и pH-чувствительного оранжевого флуоресцентного белка mNectarine – mNect-Rd и mNect-SbB, а также полноразмерная нетоксичная форма ДТ CRM197 (рис. 1). Применение двух разных флуоресцентных белков – EGFP и mCherry расширяет спектр возможных флуоресцентных зондов внутриклеточных компонентов при исследовании внутриклеточного транспорта ДТ. Кроме того, для изучения изменений pH при внутриклеточном транспорте фрагментов ДТ были получены белки с mNectarine. В аналогах mCh-SbB и mNect-SbB флуоресцентные белки mCherry или mNectarine заменяли C-домен на N-конце молекул (рис. 1), таким образом, рекомбинантные белки сохраняли рецепторсвязывающую и транспортную функцию и легко детектировались с помощью соответствующих методов анализа, однако не обладали токсичными свойствами. Получены также флуоресцентные укороченные аналоги mCh-Rd, EGFP-Rd и mNect-Rd, в которых от исходного ДТ сохранился только R-домен.

Генетические конструкции, кодирующие белки mCh-SbB, mNect-SbB, mCh-Rd, EGFP-Rd и mNect-Rd, получали путем амплификации специфическими праймерами нуклеотидных последовательностей *SbB* ДТ и *Rd* ДТ из лизатов *C. diphtheriae* штамма NCTC 10648 и флуоресцентных белков EGFP, mCherry и mNectarine из плазмид *pEGFP-N1*, *pmCherry* и *pBAD-mNectarine*. Эти праймеры поданы в таблице. Полученные нуклеотидные последовательности флуоресцентных белков и *SbB* ДТ или *Rd* ДТ объединялись в единую рамку считывания и вводились в экспрессионные векторы *pET-24a* и *pET-28a* с образованием плазмид *pET-24a-mCh-SbB*, *pET-28a-mNect-SbB*, *pET-24a-mCh-Rd*, *pET-24a-EGFP-Rd* и *pET-28a-mNect-Rd*. Данными плазмидами трансформировали бактерии *E. coli* штамма BL21 Rosetta (DE3) и отбирали колонии с высоким уровнем экспрессии необходимых белков.

Для получения полноразмерного нетоксичного белка CRM197 проводили направленный мутагенез гена ДТ с целью изменения триплета, кодирующего глицин в положении 52 на кодон глутаминовой кислоты. Данная мутация инактивирует SbA ДТ, но не влияет на функцию SbB [15].

Направленный мутагенез проводили методом SOE-PCR [16] с использованием двух пар праймеров из таблицы с нуклеотидной заменой для получения двух фрагментов токсина: первый содержал замену на конце нуклеотидной последовательности, а второй – в начале. Прямые праймеры 1-го

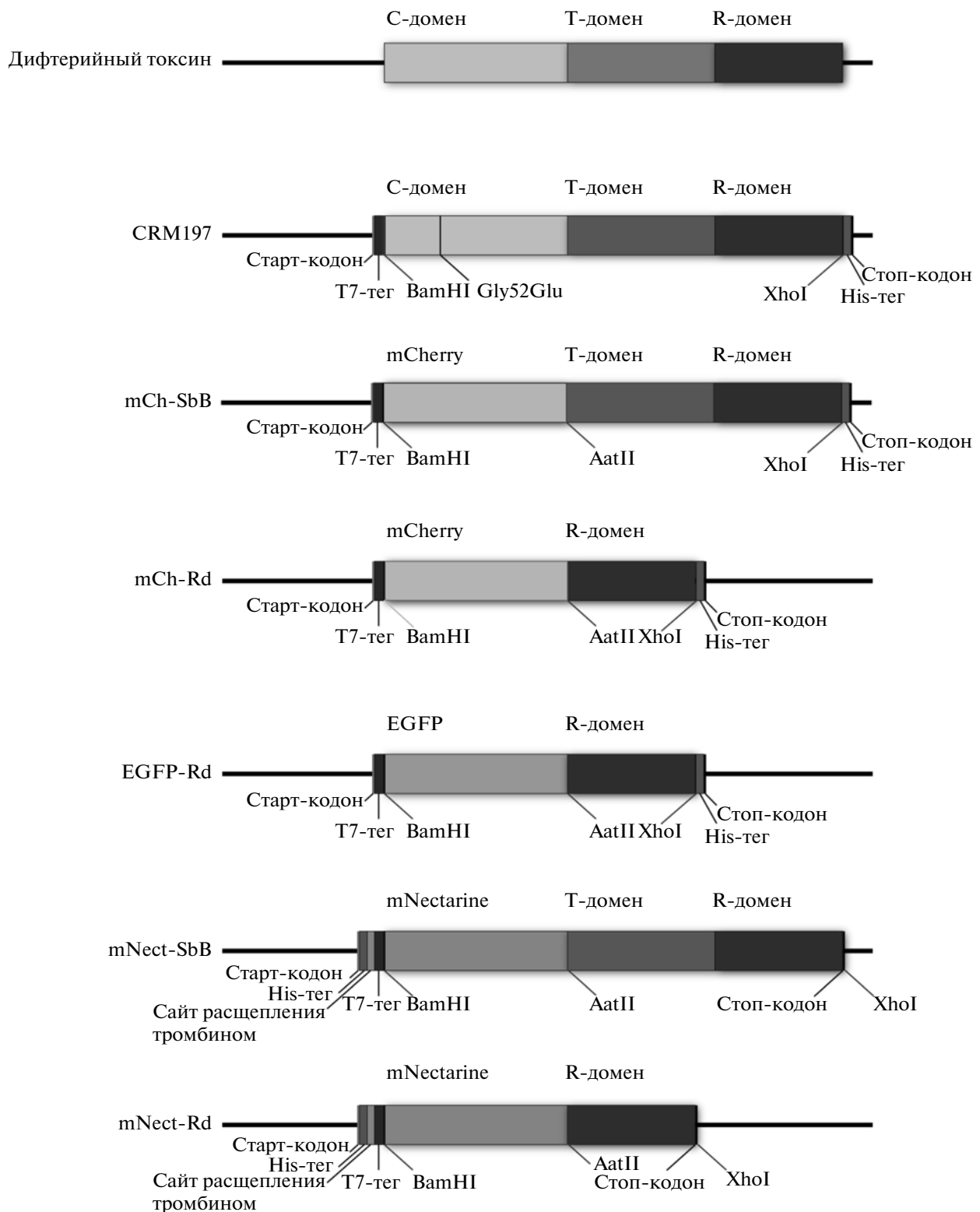


Рис. 1. Схема генетических конструкций, кодирующих белки CRM197, mCh-SbB, mCh-Rd, EGFP-Rd, mNect-SbB и mNect-Rd.

фрагмента и обратные праймеры 2-го были комплементарны, соответственно, нуклеотидные последовательности фрагментов 1 и 2 также были ча-

стично комплементарны. После смешивания фрагментов 1 и 2 была проведена достройка нуклеотидной последовательности полноразмер-

Последовательности праймеров, использованных в работе

Название	Последовательность 5' → 3'
SbA sence Bam	ACTGGATCCGGCGCTGATGATGTTGTTGATT
SbB sence Aat	GAAGACGTCATGTATGAGTATATGGCTCAAGCCTGTGC
SbB asence Xho	CTCGAGGCTCTTGATTTCAAAAAATAGCGATAGC
SbB asence st Xho	ACTCTCGAGCTAGCTCTTGATTTCAAAAAATAGCGATAGC
FP sence Bam	GAAGGATCCACCATGGTGAGCAAGGG
FP asence Aat	CCAGACGTCTTTGTACAGCTCGTCCATGCC
Rd sence Aat	CATGACGTCCCCGCGTATTCTCCGGGGGCATAA
SOE asence	GACGATGATTGGAAAGAGTTTTATAGTACCGAC
SOE sence	GTCGGTACTATAAAACTCTTTCCAATCATCGTC

ной формы токсина с введенной нуклеотидной заменой — *sgm197*, которую вводили в вектор *pET-24a* с образованием экспрессионного вектора *pET-24a-CRM197*.

Правильность проведенных операций с нуклеотидными последовательностями *pET-24a-mCh-SbB*, *pET-28a-mNect-SbB*, *pET-24a-mCh-Rd*, *pET-24a-EGFP-Rd*, *pET-28a-mNect-Rd* и *pET-24a-CRM197* была проверена путем секвенирования кодирующих регионов полученных экспрессионных конструкций (Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины).

После отбора колоний бактерий с высоким уровнем экспрессии белков *mCh-SbB*, *mNect-SbB*, *mCh-Rd*, *EGFP-Rd*, *mNect-Rd* и *CRM197* анализировали особенности их экспрессии (рис. 2). Почти все белки синтезировались в нерастворимой

форме, поэтому лизаты бактерий суспендировали в буфере с 8 М мочевиной и далее проводили ренатурацию белков путем медленного разведения по каплям в 10-кратном объеме аналогичного буферного раствора без мочевины. После ренатурации определяли выход растворимого белка, который составил для *mCh-SbB* — 2.4 мг/л, для *mNect-SbB* — 2.8 мг/л, для *mCh-Rd* — 1.6 мг/л, для *EGFP-Rd* — 1.5 мг/л, для *mNect-Rd* — 1.6 мг/л и для *CRM197* — 0.6 мг/л.

С целью оценки функциональной активности данных белков определяли их способность взаимодействовать с экспрессирующими рецептор ДТ *proHB-EGF* клетками линии Vero [19] методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. Флуоресцентные белки *EGFP*, *mNectarine* и *mCherry* использовали как контроль на не-

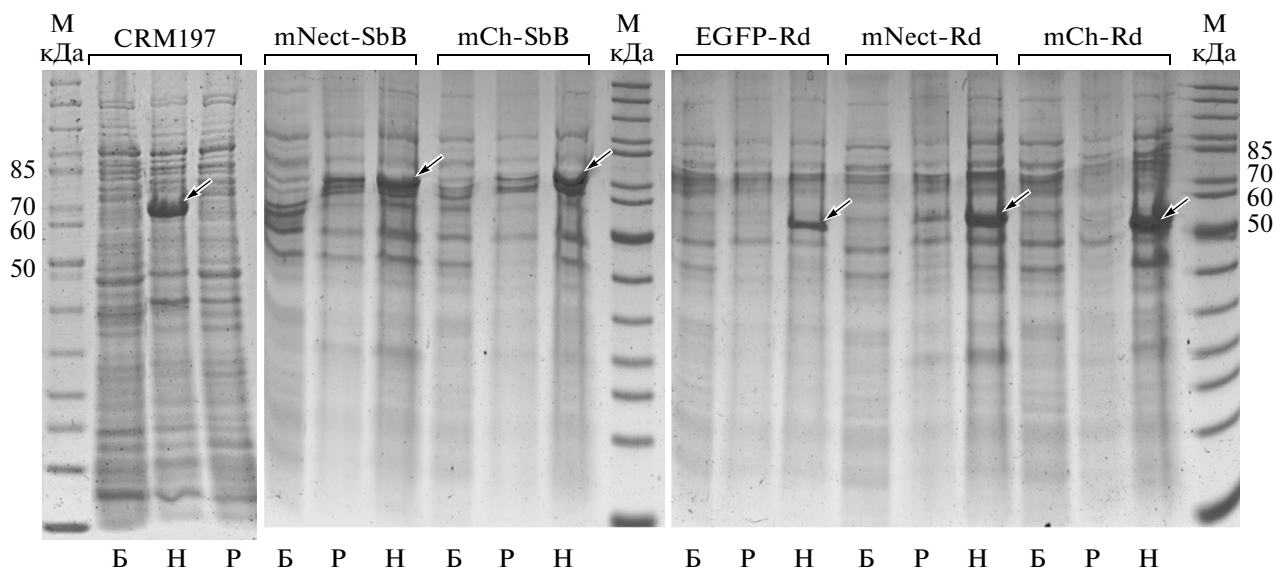


Рис. 2. Электрофореграмма лизатов бактерий-продуцентов белков CRM197, *mNect-SbB*, *mCh-SbB*, *EGFP-Rd*, *mNect-Rd* и *mCh-Rd* (соответствующие полосы показаны стрелками). Дорожки Б — лизаты бактерий без добавления IPTG; дорожки Р и Н — соответственно растворимая и нерастворимая фракции лизатов бактерий после инкубации с IPTG. М — маркеры молекулярного веса.

специфическую сорбцию, а белок EGFP-SbB выступал в качестве положительного контроля. При микроскопическом анализе ядра клеток дополнительно окрашивали Hoechst 33342.

При взаимодействии белка EGFP-Rd с клетками Vero (рис. 3а) интенсивность флуоресценции опытных клеток была более чем на 2 порядка выше, чем в контроле – с EGFP, и сравнимой с положительным контролем EGFP-SbB [14]. Интенсивность флуоресценции клеток Vero, окрашенных белками mNect-Rd и mNect-SbB, была почти в 15 и 10 раз выше флуоресценции контрольных клеток (рис. 3б). Подобная зависимость также наблюдалась для клеток, окрашенных mCh-Rd и mCh-SbB, где разница с окрашенными mCherry контрольными клетками была 9- и 6-кратная соответственно (рис. 3в).

Как видно из данных, представленных на рис. 4а–в, флуоресцентные белки EGFP, mNectarine и mCherry почти не взаимодействовали с данными клетками. Флуоресцентные производные ДТ проникали внутрь клеток в составе эндосом, расположенных преимущественно у поверхности клеток (рис. 4г–и).

Для характеристики цитотоксической активности аналога ДТ CRM197 оценивали жизнеспособность клеток Vero в присутствии CRM197 с помощью МТТ-теста. В качестве контроля использовали производное ДТ EGFP-SbB – и нативный ДТ как положительный контроль. Полученные данные указывают на отсутствие токсичности CRM197 в концентрации в 175 нМ, в то время как гибель клеток от токсина происходила при концентрации 1.3 нМ (рис. 5). Из литературных данных известно, что IC_{50} ДТ для клеток Vero составляет 175 фМ [17]. Сопоставив данные МТТ-теста о выживаемости клеток, инкубированных с CRM197, с литературными данными о токсичности ДТ, можно говорить об отсутствии токсичности белка CRM197 в концентрации в 10^3 раз превышающей LD_{50} нативного токсина.

Способность мутантного белка CRM197 взаимодействовать с рецептором ДТ оценивали с помощью конкурентного анализа в присутствии EGFP-SbB на клетках Vero методом проточной цитофлуориметрии. EGFP-SbB вносили в пробы в постоянной концентрации, достаточной для насыщения всех рецепторов клеток данным белком. За 100% принимали интенсивность флуоресценции клеток Vero, окрашенных EGFP-SbB. Согласно результатам, представленным на рис. 6, при увеличении концентрации CRM197 интенсивность флуоресценции уменьшалась и при равных концентрациях CRM197 и EGFP-SbB составляла примерно 60% от контроля, что указывает на способность CRM197 специфически взаимодействовать с рецептором ДТ.

Таким образом, в результате работы получены нетоксичные производные ДТ с различными свойствами, которые могут быть использованы для изучения его рецепторсвязывающей и транспортной функции. Флуоресцентные производные токсина могут найти применение в медицине для выявления опухолей с высоким уровнем экспрессии рецептора proHB-EGF [18–20]. Нетоксичные производные ДТ могут использоваться для получения антител к токсину и его фрагментам, а также в составе диагностических тест-систем.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали рестриктазы AatII, BamHI и XhoI, фосфатазу, лигазу, наборы для очистки ДНК производства Fermentas (Латвия), неорганические соли производства Shanghai Synnad Chemical (Китай), питательные среды LB и RPMI-1640, праймеры, а также остальные реактивы производства компании “Sigma” (США). Нативный ДТ был предоставлен Институтом биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины. Бактерии *E. coli* штамма BL21 Rosetta (DE3), плазмиды *pET-24a* и *pET-28a* (Novagen, США), *pmCherry*, *pEGFP-N1* (Clontech, США) и *pBAD-mNectarine* (Дар Dr. Danielle E. Johnson [21, 22]; Addgene plasmid # 21717). Лизаты бактерий *C. diphtheriae* штамма NCTC 10648 были предоставлены Центральной СЭС г. Киева (Украина). Клеточная линия Vero предоставлена банком клеточных линий Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины.

Буферные растворы, использованные в работе: раствор W (50 мМ Na_2HPO_4 , 0.5 М NaCl, 10 мМ имидазола, pH 8.0), раствор L (8 М мочевины в растворе W), раствор E (410 мМ имидазол в растворе W), PBS (0.14 М NaCl, 0.03 М KCl, 0.011 М Na_2HPO_4 , 2 мМ KH_2PO_4 , pH 7.2), 1% раствор BSA в PBS, раствор DABCO/PVA (2.5% DABCO, 10% PVA Type II, 5% глицерин, 25 мМ Tris, pH 8.7).

Получение генетических конструкций, кодирующих белки mCh-SbB и mNect-SbB. Для получения нуклеотидной последовательности SbB ДТ использовали смысловой праймер SbB sense Aat и антисмысловые праймеры SbB asence Xho для mCh-SbB или SbB asence st Xho для mNect-SbB. Нуклеотидную последовательность белков mCherry и mNectarine амплифицировали с использованием праймеров FP sense Bam и FP asence Aat из плазмид *pmCherry* и *pBAD-mNectarine* соответственно. Амплифицированные нуклеотидные последовательности *SbB*, *mCherry* и *mNectarine* обрабатывали эндонуклеазой рестрикции AatII и лигировали в единую нуклеотидную последовательность *mCh-SbB* и *mNect-SbB*. Далее плазмидные векторы *pET-24a* и *pET-28a* и полученные нуклеотидные последовательности *mCh-SbB* и *mNect-SbB* обрабатывали ре-

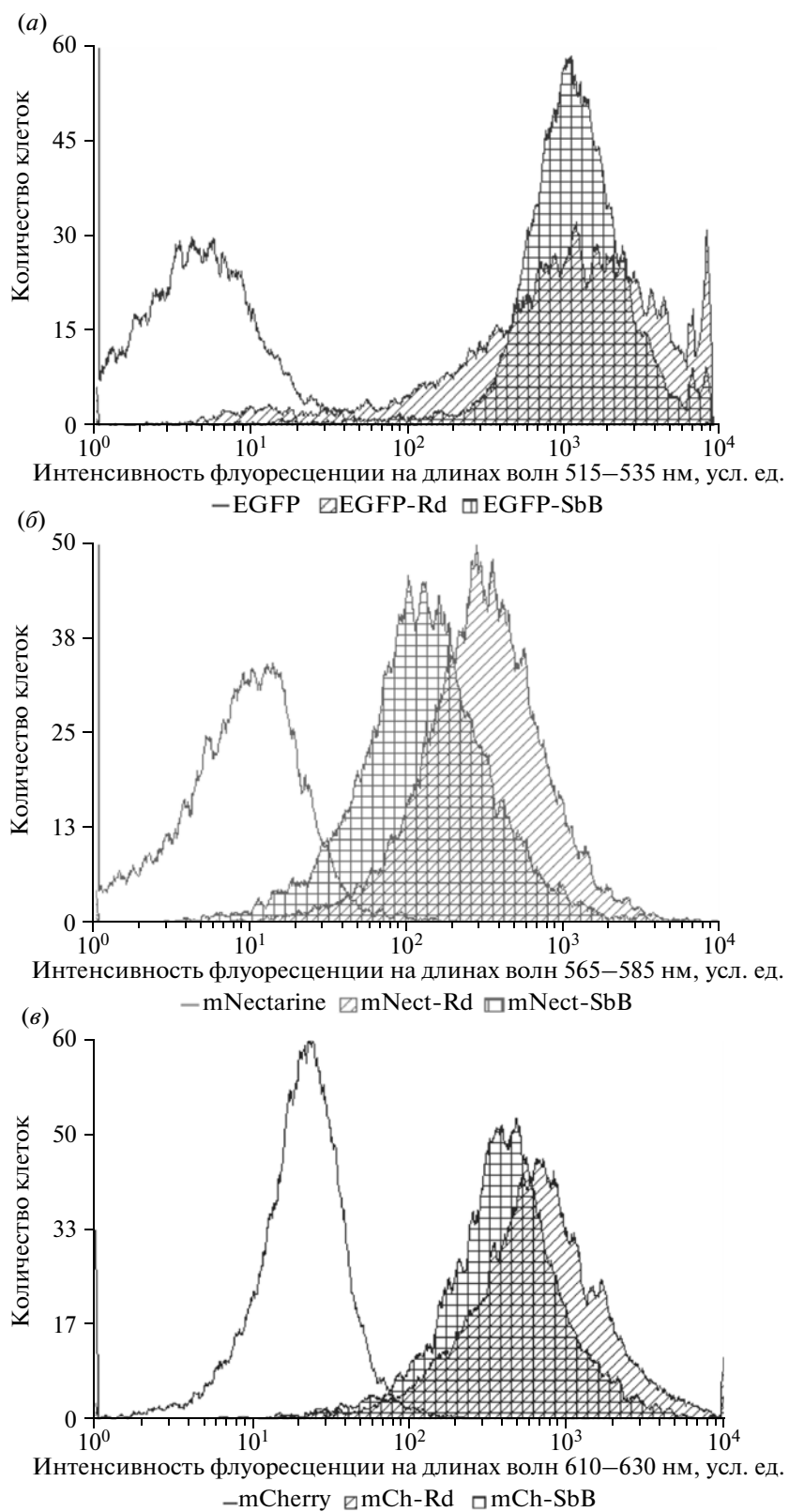


Рис. 3. Гистограммы интенсивности флуоресценции препаратов клеток линии Vero, окрашенных рекомбинантными белками: EGFP, EGFP-Rd, EGFP-SbB (а); mNectarine, mNect-Rd, mNect-SbB (б); mCherry, mCh-Rd, mCh-SbB (в).

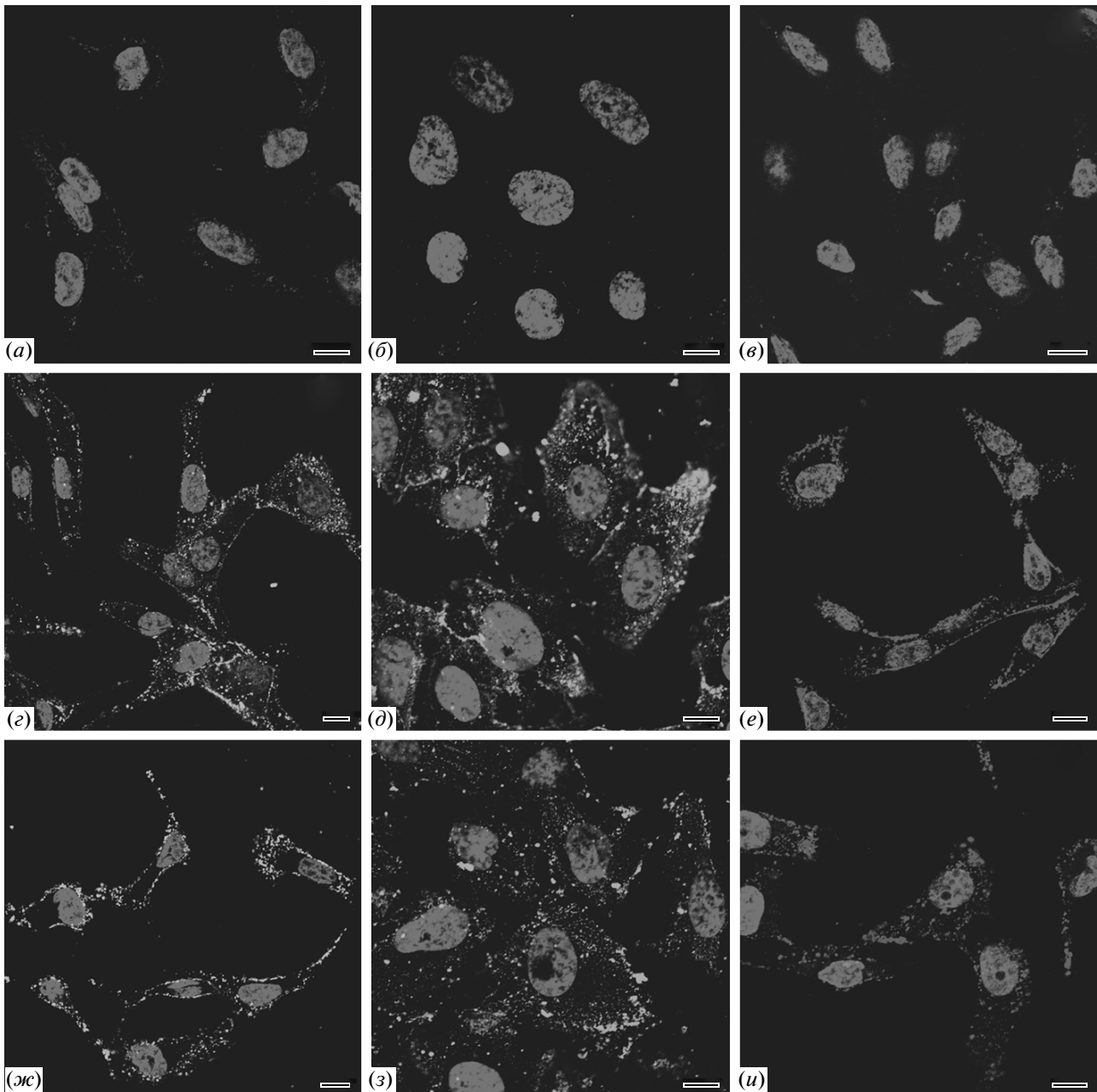


Рис. 4. Фотографии препаратов клеток линии Vero, окрашенных: EGFP (а), mNectarine (б), mCherry (в), EGFP-Rd (г), mNect-Rd (д), mCh-Rd (е), EGFP-SbB (ж), mNect-SbB (з), mCh-SbB (и). Ядра клеток окрашены Hoechst 33342. Шкала на снимках соответствует размеру 10 мкм.

стриктазами BamHI и XhoI и объединяли продукты рестрикции в последовательности экспрессионных векторов *pET-24a-mCh-SbB* и *pET-28a-mNect-SbB*.

Генетические конструкции, кодирующие белки mCh-Rd, EGFP-Rd и mNect-Rd. Нуклеотидную последовательность Rd ДТ получали из лизатов *C. diphtheriae* с помощью полимеразной реакции с использованием праймеров Rd sense Aat и SbB asense Xho (для конструкций *mCh-Rd* и *EGFP-Rd*) или Rd sense Aat и SbB asense st Xho (для кон-

струкции *mNect-Rd*). Последовательности экспрессионных векторов *pET-24a-mCh-Rd*, *pET-24a-EGFP-Rd* и *pET-28a-mNect-Rd* были получены с использованием амплифицированных последовательностей Rd, фрагментов генов, кодирующих флуоресцентные белки EGFP, mCherry и mNectarine, и плазмид *pET-24a* и *pET-28a* как описано выше.

Генетическая конструкция, кодирующая неактивную форму токсина CRM197. Ген ДТ получали из лизатов *C. diphtheriae* с использованием прай-

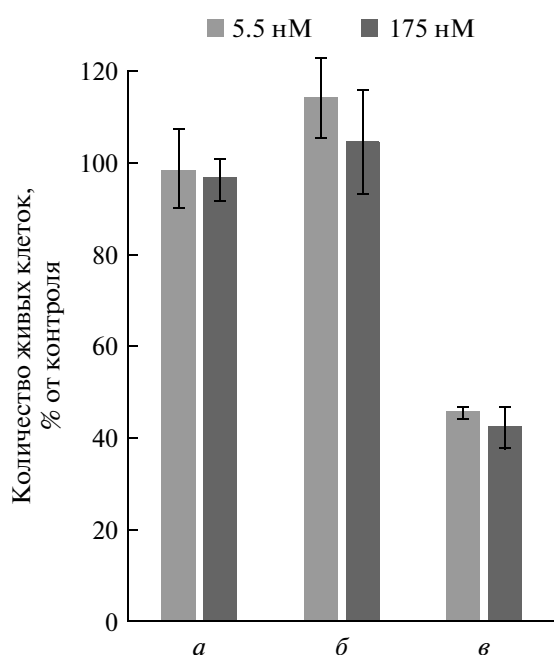


Рис. 5. Выживаемость клеток линии Vero в присутствии белков EGFP-SbB (а), CRM197 (б) и ДТ (в). За 100% принимали оптическое поглощение в МТТ-тесте от контрольных клеток.

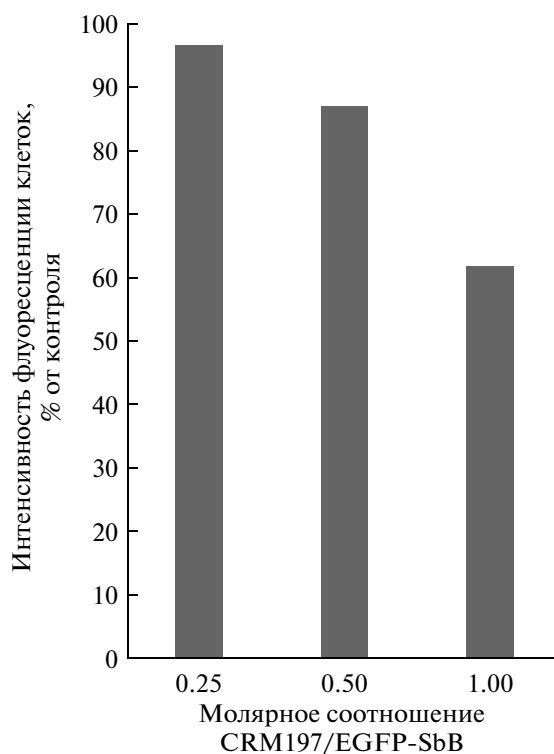


Рис. 6. Связывание рекомбинантного белка CRM197 с рецептором ДТ на клетках Vero при конкурентном вытеснении рекомбинантного белка EGFP-SbB (за 100% принимали интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных EGFP-SbB).

меров SbA sense Bam и SbB asence st Xho. Для введения в последовательность гена ДТ мутации амплифицировали две нуклеотидные последовательности размерами 177 и 1473 п.о., соответствующие фрагментам до и после нуклеотидной замены, с использованием пар праймеров SbA sense Bam и SOE asence (1-я пара) и SOE sense и SbB asence st Xho (2-я пара). Фрагменты ДНК, содержащие нуклеотидную замену, смешивали и проводили достройку полноразмерной мутантной формы гена *crm197* путем слайсинга через перекрывающиеся концы ПЦР (SOE-PCR). Для амплификации полученного гена *crm197* использовали пару праймеров SbA sense Bam и SbB asence st Xho. Полученный ген *crm197* и плазмиду *pET-24a* обрабатывали рестриктазами BamHI и XhoI и объединяли в единый экспрессионный вектор *pET-24a-CRM197*.

Рекомбинантные белки. Экспрессионными векторами pET-24a-mCh-SbB, pET-28a-mNect-SbB, pET-24a-mCh-Rd, pET-24a-EGFP-Rd, pET-28a-mNect-Rd и pET-24a-CRM197 путем электропорации трансформировали бактерии *E. coli* штамма BL21 Rosetta (DE3). Полученные бактерии высевали на чашки с твердой (с добавлением 1.5% агара) питательной средой LB с селективными антибиотиками (170 мг/л хлорамфеникола и 50 мг/л канамицина). Выросшие колонии бактерий считали положительными и проводили их отбор. Культуры клеток штаммов-продуцентов наращивали при интенсивной аэрации при 37°C и 250 об/мин в среде LB с селективными антибиотиками до оптического поглощения $A_{600} = 0.5-0.7$. Для индукции экспрессии целевого продукта в питательную среду добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ, после чего инкубировали еще 3 ч при температуре 30°C и перемешивании 250 об/мин, отбирая пробы для анализа экспрессии. Осадок бактерий после центрифугирования ресуспендировали в буферном растворе L и обрабатывали на ультразвуковом дезинтеграторе трижды по 20 ударов. Затем суспензию центрифугировали 10 мин при 10 000 g и отбирали надосадочную фракцию. Для ренатурации белков надосадочную фракцию добавляли по каплям при постоянном перемешивании к 10 объемам буферного раствора W и полученную суспензию осветляли, центрифугируя в течение 10 мин при 10 000 g.

На предварительно уравновешенную буферным раствором W колонку с Ni-NTA агарозой вносили раствор с ренатурированными белками и промывали 5 объемами буферного раствора W. Для элюции белков использовали раствор E. Электрофоретическое разделение белков в ПААГ-SDS проводили по модифицированной методике с добавлением трицина [23].

Для культивирования культуры клеток Vero использовали питательную среду RPMI-1640 с L-глутамином, содержащую 5% фетальной сыворотки

крупного рогатого скота, стрептомицин (100 мг/л), пенициллин (10000 U/л) и амфотерицин В (250 мкг/л). Для МТТ-теста [24] клетки линии Vero высевались в 96-луночные планшеты из расчета 50000 клеток на лунку за 12 ч до начала эксперимента. Затем клетки инкубировали еще 12 ч в присутствии белков EGFP-SbB, CRM197 и нативного ДТ в концентрации 175 нМ. По истечении указанного времени содержимое лунок заменяли на раствор 0.5 мг/мл МТТ в среде RPMI-1640 и выдерживали клетки примерно 4 ч до образования фиолетовых кристаллов формазана. Удаляли среду и лизировали клетки раствором 10% SDS и 0.6% уксусной кислоты в DMSO. Оптическое поглощение раствора измеряли на планшетном спектрофотометре Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США) при 545 нм и 650 нм.

Проточная цитометрия. Для окраски флуоресцентными белками клетки Vero в количестве $3-5 \times 10^5$ клеток на пробу осаждали в течение 10 мин при 200–300 g и добавляли к ним по 725 нМ белка в 200 мкл раствора BSA/PBS.

Для конкурентного анализа взаимодействия мутантного белка CRM197 к осадку клеток добавляли 200 мкл раствора BSA/PBS, содержащего смесь белков: EGFP-SbB в концентрации, достаточной для насыщения всех клеточных рецепторов, 2.94 мкМ [14] и CRM197 в концентрациях 735 нМ, 2.94 мкМ или 147 мкМ. Клетки инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Несвязавшиеся белки отмывали раствором BSA/PBS.

Определение интенсивности флуоресценции клеток проводили с помощью цитофлуориметра Coulter Epics XL (Beckman Coulter, США).

Конфокальная микроскопия. Клетки линии Vero, выращенные на покровных стеклах до 50%-ного конфлюэнтного монослоя, инкубировали в присутствии флуоресцентных белков в концентрации 145 нМ и красителя Hoechst 33342 в концентрации 10 мкМ в среде RPMI-1640 30 мин при 37°C. Несвязавшиеся белки отмывали средой RPMI-1640, клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида в 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.4 в течение 40 мин при 4°C. Покровное стекло с клетками фиксировали на предметном стекле в растворе DAVCO/PVA.

Препараты анализировали на конфокальном микроскопе Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Германия) с использованием масляного иммерсионного объектива Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC. Для возбуждения хромофора EGFP использовали лазер с длиной волны 488 нм, а для возбуждения хромофоров mCherry и mNectarine — 543 нм, интенсивность флуоресценции регистрировали на каналах 505–530 нм для EGFP и 560–615 нм для mCherry и mNectarine. Краситель Hoechst 33342 возбуждали лазером с длиной волны 405 нм и детектировали по каналу 420–480 нм. Обработка ре-

зультатов производилась с помощью программного обеспечения Zeiss ZEN 2012.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Freeman V.J., Morse I.U. // J. Bacteriol. 1952. V. 63. № 3. P. 407–414.
2. Collier R.J. // Bacteriol. Rev. 1975. V. 39. № 1. P. 54–85.
3. Choe S., Bennett M.J., Fujii G., Curmi P.M., Kantardjiev K.A., Collier R.J., Eisenberg D. // Nature. 1992. V. 357. № 6375. P. 216–222.
4. Bennett M.J., Choe S., Eisenberg D. // Protein Sci. Publ. Protein Soc. 1994. V. 3. № 9. P. 1444–1463.
5. Naglich J.G., Metherall J.E., Russell D.W., Eidels L. // Cell. 1992. V. 69. № 6. P. 1051–1061.
6. Louie G.V., Yang W., Bowman M.E., Choe S. // Mol. Cell. 1997. V. 1. № 1. P. 67–78.
7. Collier R.J. // Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology. 2001. V. 39. № 11. P. 1793–1803.
8. Chenal A., Prongidi-Fix L., Perier A. et al. // J. Mol. Biol. 2009. V. 391. № 5. P. 872–883.
9. Romaniuk S.I., Kolibo D.V., Komisarenko S.V. // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2012. V. 38. № 6. P. 639–652.
10. Gill D.M. // Microbiol. Rev. 1982. V. 46. № 1. P. 86–94.
11. Sims N.R.A. The Evolution of Biological Disarmament. Oxford University Press. 2001.
12. Ratts R., Trujillo C., Bharti A., vanderSpek J., Harrison R., Murphy J.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 43. P. 15635–15640.
13. Trujillo C., Taylor-Parker J., Harrison R., Murphy J.R. // Mol. Microbiol. 2010. V. 76. № 4. P. 1010–1019.
14. Кабернюк А.А., Лабынцев А.Ю., Колибо Д.В., Олейник Е.С., Редчук Т.А., Короткевич Н.В., Горчев В.Ф., Карахим С.А., Комисаренко С.В. // Укр. Биохим. Журн. 2009. V. 81. № 1. С. 67–77.
15. Uchida T., Pappenheimer A.M. Jr., Greany R. // J. Biol. Chem. 1973. V. 248. № 11. P. 3838–3844.
16. Johnson D.E., Ai H.-W., Wong P., Young J.D., Campbell R.E., Casey J.R. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. № 31. P. 20499–20511.
17. Johnson D.E., Casey J.R. // J. Physiol. 2011. V. 589. № Pt. 7. P. 1551–1569.
18. Higuchi R., Krummel B., Saiki R.K. // Nucleic Acids Res. 1988. V. 16. № 15. P. 7351–7367.
19. Middlebrook J.L., Dorland R.B., Leppla S.H. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 20. P. 7325–7330.
20. Miyazono K. // J. Biochem. (Tokyo) 2012. V. 151. № 1. P. 1–3.
21. Shimura T., Yoshida M., Fukuda S. et al. // BMC Cancer. 2012. V. 12. № 1. P. 205.
22. Sato S., Kamada H., Watanabe T., Tsuji I., Fan J. // PloS One. 2013. V. 8. № 1. P. e54509.
23. Schägger H., von Jagow G. // Anal. Biochem. 1987. V. 166. № 2. P. 368–379.
24. Van de Loosdrecht A.A., Beelen R.H.J., Ossenkoppele G.J., Broekhoven M.G., Langenhuijsen M.M.A.C. // J. Immunol. Methods 1994. V. 174. № 1–2. P. 311–320.

Recombinant Fluorescent Models for Studying of Diphtheria Toxin

A. J. Labyntsev*, N. V. Korotkevych*, K. J. Manoilov*, A. A. Kaberniuk**,
D. V. Kolybo*, S. V. Komisarenko*

Phone: +380-(44) 234-33-54; e-mail: lab.andrey@gmail.com

*Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine,
9 Leontovicha Street, Kyiv, 01601, Ukraine

**Albert Einstein College of Yeshiva University, New York, USA

Diphtheria toxin is the main pathogenicity factor of causative agent of diphtheria *Corynebacterium diphtheriae*. Due to the small molecule size, it is of considerable interest for the development of synthetic protein molecules with transporting function, e.g. immunotoxins. Expression and characterization of nontoxic recombinant fluorescent derivatives of diphtheria toxin and its nontoxic mutant CRM197 were described in this article. Obtained proteins may be applied in studies of receptor-binding and transporting functions of the toxin in cells, for determination of toxin receptor proHB-EGF expression level, immunization and antibody generation against the toxin and in development of diagnostic test-systems, detection of diphtheria toxin and anti-toxic antibodies.

Keywords: recombinant nontoxic bacterial toxin analogues, fluorescent proteins, molecular cloning, proHB-EGF