

NOVEL MATERIAL: BIOCOMPATIBLE GLUE FOR USE IN BIOLOGY AND MEDICINE—RECOMBINANT MUSSELADHESIVE PROTEINS

Axambayeva A.S.¹, Shagyrova Zh.S.¹, Nurgozhin T.S.², Zhienbay E.², Shustov A.V.¹

¹ National Center for Biotechnology

Korgalzhyn hwy, 13/5, Astana, 010000, Kazakhstan

² Nazarbayev University

Kabanbai Batyr avenue, 53, Astana, 010000, Kazakhstan

altyn-ai@bk.ru

ABSTRACT

Mussel adhesive proteins (MFPs) help mussels to attach to various surfaces. Natural MFPs present in the adhesive discs of the byssal threads of the mussels exhibit a number of good adhesive properties that can be used in medicine, orthodontics, and cell and tissue engineering. MFPs can be used to glue a variety of materials, natural and artificial. For use in medicine, it is important that the MFPs are waterproof adhesives, effectively bonding surfaces submerged in water. Natural MFPs are already being used as adhesives, but their utilization is limited because of high costs.

Recombinant MFPs are an attractive alternative because they can be produced in large quantities. For the recombinant MFPs produced by *Escherichia coli* to possess adhesive properties, post-translational modification of tyrosine residues to 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) is required.

This paper describes an expression system in which the recombinant adhesive protein Fp-131 is produced, and the newly synthesized polypeptide undergoes modification of the tyrosine residues to DOPA. Hydroxylation of tyrosine occurred *in vivo* in the bacterial cells because of the activity of tyrosinase, which is coexpressed with Fp-131. Coexpression of Fp-131 and tyrosinase was achieved through the expression of the proteins from two plasmids with different origins of replication and resistance markers.

Fp-131 was purified using metal affinity chromatography under denaturing conditions. After dialysis and freeze-drying, a product was obtained with an yield of 25 mg from 1 L of the induced culture. Presence of DOPA was demonstrated in Fp-131 by using a colour reaction with NBT. The adhesion strength of Fp-131 was measured using the lap-shear test. For this test, Fp-131 was used to glue two flat adherends, and a shear load was attached to the glued joint. The adhesive strength was 1.1 MPa, which is comparable to that of natural MFPs.

Keywords: adhesive protein, mussels, tyrosinase, DOPA, adhesion strength, biocompatible glue

УДК 577.32

НОВЫЙ МАТЕРИАЛ: БИОСОВМЕСТИМЫЙ КЛЕЙ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ – РЕКОМБИНАНТНЫЙ АДГЕЗИВНЫЙ БЕЛОК МИДИЙ

Аксамбаева А.С.¹, Шагырова Ж.С.¹, Нургожин Т.С.², Жиенбай Е.², Шустов А.В.¹

¹Национальный центр биотехнологии

Кургельжинское шоссе, 13/5, Астана, 010000, Казахстан

²Назарбаев Университет

пр. Кabanбай батыра, 53, Астана, 010000, Казахстан

altyn-ai@bk.ru

АБСТРАКТ

Адгезивные белки мидий (MFP) обеспечивают прикрепление мидий к субстрату, на котором растут моллюски. Природные MFP, присутствующие в прикрепительных дисках биссусных нитей мидий, демонстрируют ряд свойств, которые отличают хорошие клеи для медицины, ортодонтии, клеточной и тканевой инженерии. Для того, чтобы рекомбинантные MFP, произведённые в *E. coli*, обладали адгезивными свойствами, требуется обеспечить посттрансляционную модификацию остатков тирозина в остатки 3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА).

В данной статье описана генно-инженерная система, в которой производится рекомбинантный адгезивный белок Fr-131, и в новосинтезированном полипептиде остатки тирозина модифицируются в ДОФА. Белок Fr-131 очищен с помощью металлоаффинной хроматографии в денатурирующих условиях. Присутствие остатков ДОФА в Fr-131 продемонстрировано в цветной реакции с NBT. Адгезионную прочность соединения, склеенного Fr-131, измерили методом сдвига. С помощью Fr-131 склеивали пластины-адгеренты, к которым прикладывали сдвиговую нагрузку. Адгезионная прочность составила 1,1 МПа, что сравнимо с таковой у природных МГР.

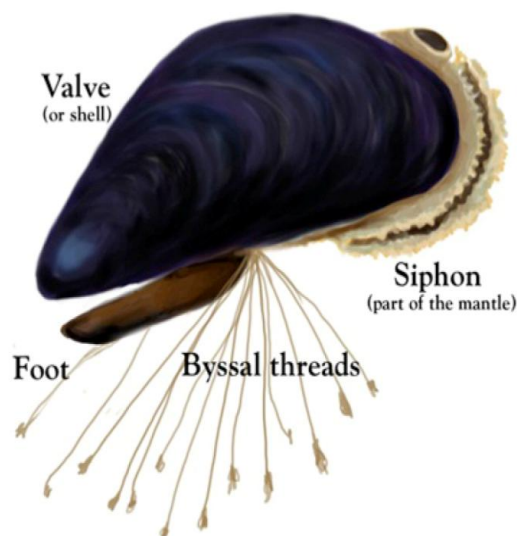
Ключевые слова: адгезивный белок, мидии, тирозиназа, ДОФА адгезионная прочность, биосовместимый клей.

ВВЕДЕНИЕ

Биосовместимые адгезивные материалы (клеи) имеют огромный потенциал применения в медицине и биотехнологии. К адгезивным материалам, предназначенным для склеивания живых тканей в организме человека или животных, предъявляются ряд специальных требований, среди которых – биосовместимость, биodeградируемость и способность к адгезии в водной среде [1]. Для большинства синтетических клеев на основе химически синтезированных полимеров адгезия к влажным поверхностям слабая, ей препятствуют высокие диэлектрические и сольватационные свойства воды [2]. Создание клеев для применения в медицине и решение проблемы молекулярной адгезии в водной среде возможны путём воссоздания в лабораторных условиях природных адгезивных материалов с нужными свойствами.

В природе есть примеры быстрой и сильной адгезии к влажным поверхностям, в том числе к объектам, находящимся под водой. Сотни видов беспозвоночных животных, у которых весь жизненный цикл или его часть проходят в воде, обладают способностью приклеиваться под водой или прикреплять яйца, или строить убежища из песка, склеивая частицы песка клейкими секретами. В литературе описаны результаты исследования адгезивных биополимеров, продуцируемых представителями четырёх отрядов беспозвоночных животных, таких как мидии (тип *Mollusca*, класс *Bivalvia*, отряд *Mytiloida*) [3], усногие раки (тип *Arthropoda*, класс *Maxillopoda*, отряд *Sessilia*) [4], многочетинковые черви (тип *Annelida*, класс *Polychaeta*, отряд *Canalipalpata*) [5] и личинки ручейников (тип *Arthropoda*, класс *Insecta*, отряд *Trichoptera*) [6].

Мидии (двустворчатые моллюски из семейства *Mytilidae*) живут в приливной зоне, где подвергаются постоянному воздействию морского прибоя, но противостоят разрушающему воздействию волн благодаря тому, что прочно прикрепляются к скалам, сваям, гальке и пр. Мидии прикрепляются к субстрату с помощью особых структур в форме нитей, называемых биссусными нитями (а совокупность прикрепительных нитей называется биссусом) (рис. 1).



В левой части рисунка – фотография мидии в естественной среде. Видны многочисленные биссусные нити, заканчивающиеся прикрепительными дисками. В правой части – рисунок мидии, обозначены части моллюска и биссус

Рис. 1. Мидии и их биссусный аппарат

Left panel –photo of a mussel in a natural environment. Visible are numerous byssus threads, each terminated with an adhesive disk. Right panel–schematic representation of mussel, parts of mollusk body and byssus are labeled

Fig. 1. Mussels and their byssus apparatus

Биссусные нити формируются при участии биссусовой железы, находящейся в ноге мидии – мышечном органе, который моллюск может высовывать из раковины. Биссусовая железа секретирует жидкий раствор белков, который, попав в воду, отвердевает и превращается в биссусные нити. Каждая биссусная нить заканчивается конусообразной расширенной частью (т.н. прикрепительный диск), которая непосредственно контактирует с поверхностью субстрата. Биссусные нити не содержат живых клеток и состоят преимущественно из белков. Биссус мидий содержит примерно 25-30 различных белков, а в прикрепительных дисках до 78 разных белков, но только несколько белков обнаружены лишь в прикрепительных дисках [2]. Ряд белков, обнаруженных в биссусе, получили название «белки ноги мидий» (mussel foot proteins, MFP). Отличительной особенностью аминокислотных последовательностей MFP является высокая массовая доля остатков тирозина (Tyr), в особенности в последовательностях белков MFP-1 и MFP-3. Второй замечательной особенностью MFP является то, что в выделяемых из природного источника MFP существенная доля Tyr (3-30 mol%) превращена в остатки 3,4-дигидроксибензил-L-аланина (ДОФА) [7]. Остатки ДОФА появляются в MFP в результате посттрансляционной модификации, заключающейся в гидроксировании Tyr. Другими особенностями природных MFP являются то, что эти белки в очищенном виде проявляют адгезивные свойства и способны склеивать поверхности, находящиеся в контакте с водой [8,9]. MFP проявляют адгезивные свойства к поверхностям разнообразных материалов, природных и искусственных, неорганических и органических [10,11].

Белки, которые обнаруживаются только в прикрепительном диске, привлекают особое внимание, потому что именно эти белки обеспечивают адгезию. Среди белков, обнаруженных в биссусных нитях, но не уникальных для прикрепительного диска – белок MFP-1, преполимеризованные коллагены (Prcol-D и Prcol-NG) и белки биссусного матрикса (tmp-1). Белок MFP-1 является основным компонентом внешней оболочки (кутикулы) биссусной нити. Белки, обнаруженные только в прикрепительном диске – MFP-2, MFP-3, MFP-4, MFP-5 и MFP-6 [2]. Белки MFP-3 и MFP-5 отличаются особенно высоким содержанием ДОФА, а также демонстрируют наибольшую адгезионную способность среди всех природных MFP. Поскольку Tyr и ДОФА по химической природе являются фенолами, указанные MFP также называют полифенольными белками. Показано, что именно присутствие в большом количестве ДОФА играет фундаментальную роль в механизме молекулярной адгезии MFP [7]. Остатки ДОФА участвуют в начальной фазе адгезии белка к поверхностям природных материалов, которая включает образование координационных связей между гидроксильными группами ДОФА и присутствующими на поверхностях катионами металлов, легко образующих координационные связи (таких как ионы железа, меди и пр.), а также гидроксильные группы ДОФА могут участвовать в образовании водородных связей с экспонированными на поверхности субстрата атомами кислорода [12]. Далее, остатки ДОФА легко окисляются кислородом в орто-хинон (ДОФА-хинон), который, в свою очередь, легко образует ковалентные связи с разнообразными молекулами, имеющими двойные связи или гетероатомы. Данный процесс приводит к кросс-сшивке белков по остаткам ДОФА-хинона и появлению ковалентных связей между молекулами белка и субстрата, что сопровождается упрочнением клеевого соединения [13,14].

В настоящее время промышленно выпускается биосовместимый клей на основе смеси природных MFP, который коммерчески доступен под брендовым названием Cell-Tak (Corning Cat# #354240). Cell-Tak представляет собой смесь природных белков MFP-1 и MFP-2, с незначительной долей MFP-3, которую экстрагируют из биссуса мидий с помощью кислой экстракции. Производитель рекомендует Cell-Tak для использования в качестве искусственного внеклеточного матрикса (покрытие для культуральных сосудов), а также в качестве адгезива для прикрепления живых тканей в экспериментах *ex vivo* [15] (см. также <http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/media/pdf/SPC-354240.pdf>). Производство данного биоадгезива – трудоемкий процесс: чтобы получить 1 г продукта, требуется обработать биссус от 10000 мидий [16], поэтому цена Cell-Tak высока (>USD 200 за грамм у производителя). Для того чтобы снизить стоимость адгезивных белков с потенциалом применения в медицине, клеточной инженерии и других областях, и получать эти перспективные материалы в большом количестве, были предприняты попытки получения рекомбинантных MFP [16,17]. Однако коммерческого производства рекомбинантных MFP в мире пока не создано. В данной статье описана технология получения рекомбинантного MFP, обозначенного Fp-131, который не идентичен по аминокислотной последовательности ни одному из природных MFP, но имеет мотивы первичной структуры, заимствованные из последовательностей MFP-1 и MFP-3.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Штаммы

В работе использовали *E. coli* DH5 α для получения генно-инженерных конструкций и BL21(DE3) для белковой экспрессии, в том числе для совместной экспрессии (коэкспрессии) двух рекомбинантных белков – Fp-131 и тирозиназы *Verrucomicrobium spinosum*.

Синтез фрагментов ДНК de novo

Фрагменты ДНК, содержащие гены Fr-131 или тирозиназы из бактерии *V. spinosum*, синтезировали *de novo* из синтетических олигонуклеотидов. Использовали метод синтетической ПЦР. С использованием нуклеотидной последовательности целевого гена рассчитывали протяжённые (60-мерные) олигонуклеотиды, которые чередуются в порядке “sense” -> “antisense” -> “sense”-> и т.д. При этом соседние праймеры имеют перекрывающиеся последовательности и рассчитаны таким образом, что способны гибридизоваться друг с другом с расчётной температурой отжига 60°C. Таким образом, для каждого целевого гена был рассчитан набор олигонуклеотидов, которые в совокупности перекрывают всю последовательность гена. Данный набор олигонуклеотидов обозначили как «внутренние» праймеры. В ходе синтеза использовали также одну пару коротких «фланкирующих» праймеров (один праймер в ориентации «sense» и один «antisense»), которые нацелены на участки на концах синтезируемого фрагмента ДНК.

Синтез фрагментов ДНК проводили с помощью ПЦР в два раунда. Для обоих раундов ПЦР использовали высокоточную полимеразу Phusion (Thermo Scientific) и буферную систему, рекомендованную производителем, с конечной концентрацией Mg²⁺ 1,5 мМ. Реакционная смесь ПЦР I раунда (25 мкл) содержит все «внутренние» праймеры (каждый праймер в концентрации 1 пМ/мкл). Проводили 30 циклов амплификации (95°C-1', 60°C-1', 72°C-1'). Продукт амплификации I раунда использовали в качестве матрицы в ПЦР II раунда. Для этого смесь продуктов стохастического синтеза на первом раунде в количестве 1 мкл вносили в реакционную смесь II раунда (полный объём 25 мкл). В качестве праймеров в ПЦР II раунда вносили только пару «фланкирующих» праймеров, каждый в концентрации 2 пМ/мкл. Продукт синтеза появляется на II раунде амплификации. Реакционную смесь II раунда разделяли электрофорезом в геле 1% легкоплавкой агарозы, фрагмент ожидаемой длины выделяли из геля и клонировали с использованием набора pGEM-T Easy Cloning System (Promega). Вставки в полученных клонх секвенировали по обеим цепям для подтверждения соответствия синтетических генов расчётным последовательностям.

Сборка плазмид для белковой экспрессии

Для сборки генно-инженерной конструкции для экспрессии белка Fr-131 использовали экспрессионный вектор pET28c (Novagen). Плазида, предназначенная для экспрессии тирозиназы *V. spinosum*, получена с использованием экспрессионного вектора pRSET B (Invitrogen). Вставки синтетических генов вырезали из клонов в векторе pGEM-T по сайтам рестрикции NcoI и HindIII. Очищенные фрагменты (NcoI-HindIII) лигировали с соответствующими векторами, приготовленными из плазмид pET28c или pRSET-B путём гидролиза рестриктазами NcoI+HindIII в присутствии фосфатазы FastAP. Лигазными смесями трансформировали хемокомпетентные клетки штамма DH5α. В результате скрининга выросших трансформантов и рестриктоного анализа ДНК были отобраны плазмиды Alt18.pET28-Fr-131 (конструкция для экспрессии Fr-131) и Alt17.pRSET-Tyr (конструкция для экспрессии тирозиназы). Плазида Alt18.pET28-Fr-131 кодирует устойчивость к антибиотикам канамицину, а плазида Alt17.pRSET-Tyr кодирует устойчивость к ампициллину.

Получение штамма-продуцента и анализ белковой экспрессии в культурах малого объёма

Клетки штамма BL21(DE3) трансформировали смесью плазмид Alt18.pET28-Fr-131 и Alt17.pRSET-Tyr. Трансформантов высеивали на агаризованную среду, содержащую ампициллин (60 мкг/мл) и канамицин (50 мкг/мл).

Для оценки характера белковой экспрессии штаммом-продуцентом засеивали культуру в 100 мл среды LB с добавлением ампициллина (150 мкг/мл) и канамицина (50 мкг/мл). Культуру выращивали при 37°C при интенсивном перемешивании (250 об/мин) до достижения оптической плотности A₆₀₀ = 0,8. В этот момент брали пробу (1 мл) культуры (это проба «до индукции»). К культуре добавляли индуктор белковой экспрессии IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Через интервалы времени (1, 2, 3, 4, 5 и 6 ч или после инкубации в ночь) брали пробы культуры по 1 мл. Из проб культуры бактериальные клетки осаждали центрифугированием (10000 об/мин, 5 мин), ресуспендировали осадок бактерий в 1 мл буфера HN (20 мМ HEPES pH7,5; 150 мМ NaCl) и разрушали клетки обработкой ультразвуком на соникаторе (3 пульса по 30 сек, на максимальной мощности). Белковый состав полученных проб исследовали гель-электрофорезом в 15% денатурирующем полиакриламидном геле (SDS-PAGE). После электрофореза гели окрашивали раствором Кумасси R250.

Выделение адгезивного белка Fr-131, коэкспрессированного с тирозиназой

Засеивали штаммом-продуцентом BL21(DE3)/Alt17+Alt18 накопительную культуру в 5 мл среды LB с ампициллином (150 мкг/мл) и канамицином (50 мкг/мл). Выращивали накопительную культуру при 37°C, при перемешивании (250 об/мин). Накопительную культуру переносили целиком в 1 л среды ТВ (12 г/л бакто-триптон, 24 г/л дрожжевой экстракт, 4 мл/л глицерин, 2,31 г/л KH₂PO₄, 12,54 г/л K₂HPO₄, pH 7,0) с антибиотиками в вышеуказанных концентрациях. Производящую культуру инкубировали 10-12 ч. Далее в культуру вносили IPTG до 1 мМ и продолжали инкубацию ещё 6 ч. Бактериальную биомассу осаждали центрифугированием (6000 об/мин, 10 мин). Осадок клеток (~6 г) ресуспендировали в дистиллированной воде и осаждали ещё раз. Промытый осадок ресуспендировали до получения 10% суспензии в буфере для обработки лизоцимом (20% сахароза; 20 мМ HEPES pH 7,5; 5 мМ EDTA; 0,1% Triton X-100). К суспензии добавляли лизоцим до конечной концентрации 1 мг/мл, ДНКазу I (до 10 мкг/мл), РНКазу А (до 100 мкг/мл) и ингибитор протеаз PMSF (до 0,2 мМ). Смесь инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Полноты

лизиса достигали обработкой ультразвуком на соникаторе (делали 7 пульсов по 30 сек с паузами по 3 мин для охлаждения, на максимальной мощности). Нерастворимую фракцию, содержащую тельца включения, получали центрифугированием клеточного лизата (12000 об/мин, 20 мин, 4°C). Осадок ресуспендировали в буфере А для металлоаффинной хроматографии, содержащем 8М мочевины (20 мМ Na₂PO₃, 500 мМ NaCl, 30 мМ имидазол, 8М мочевины). Суспензию осадка телец включения в буфере с мочевиной обрабатывали ультразвуком (3 пульса по 20 сек) для перехода агрегатов белка в суспензию и ускорения растворения белка. Суспензию инкубировали на мешалке в течение 15 мин. Далее раствор белка осветляли центрифугированием (12000 об/мин, 1 час, 4°C). Полученный супернатант использовали для очистки белка Fr-131 с помощью металлоаффинной хроматографии.

Колонку HiTrap Chelating 5 ml (GE Healthcare) насыщали ионами никеля Ni²⁺ по протоколу производителя и уравнивали буфером А с 8М мочевиной. Через колонку пропускали раствор белков, экстрагированных из телец включения. Колонку с адсорбированным белком промывали, пропуская через неё 3 CV буфера А с 8М мочевиной, и присоединяли колонку к хроматографу АКТА Purifier 10 (GE Healthcare). Элюцию белка, связанного с металлоаффинным сорбентом, проводили градиентом имидазола 20-500 мМ (градиент 100%А->100%В, состав буфера В: 500 мМ Na₂PO₃, 500 мМ NaCl, 30 мМ имидазол, 8М мочевины). Фракции, соответствующие хроматографическому пику, объединяли в один препарат.

К объединённым фракциям добавляли уксусную кислоту до конечной концентрации HOAc 25%. Полученный кислый раствор переносили в мешок, сделанный из диализной мембраны (Sigma D9777). Проводили диализ сначала против 2 л 5% уксусной кислоты в течение ночи, затем против 2 л дистиллированной воды в течение ночи. Так получали раствор после диализа, прозрачный, бесцветный, не нуждающийся в осветлении и содержащий 0,5-1 мг/мл целевого рекомбинантного белка. Целевой продукт получали в форме лиофилизата, для чего раствор белка после диализа высушивали на лиофильной сушилке Lyotrap (LTE Scientific). В результате получали рыхлый, по виду подобный вате, препарат белка белого цвета.

Демонстрация активности тирозиназы

К 50 мл расплавленной агаризованной среды CR (5 г/л NaCl, 0,1 г/л CaCl₂, 10 г/л пептон, 5 г/л гидролизат казеина, 15 г/л агар) добавляли тирозин до конечной концентрации 0,01 г/мл, раствор CuSO₄ (0,2М) до конечной концентрации иона меди 0,2 мМ, ампициллина (150 мкг/мл), канамицина (50 мкг/мл) и индуктора экспрессии рекомбинантных белков IPTG до 0,2 мМ. Полученную индикаторную среду разливали в чашки Петри. На поверхность индикаторной среды высевали штрихом штамм-продуцент. Рост колоний штамма-продуцента сопровождается появлением чёрного гало вокруг колоний. В качестве контроля специфичности теста на индикаторную среду высевали нетрансформированный штамм BL21(DE3).

Обнаружение модифицированных остатков Туг

Наличие в рекомбинантном белке Fr-131 продуктов модификации остатков Туг (ДОФА или ДОФА-хинона) обнаруживали с помощью реакции восстановления нитросинего тетразолия (NBT) в щелочном глициновом буфере. Эта реакция приводит к образованию нерастворимого продукта пурпурного цвета – формазана [18]. Каплю (2 мкл) раствора белка с концентрацией 1 мг/мл наносили на полоску из нитроцеллюлозной мембраны для вестерн-блота (HyBond, Amersham). Полоску погружали в раствор NBT (0,6 мг/мл) в 2М глициновом буфере pH 10 и инкубировали при 37°C до появления в месте нанесения белка Fr-131 на полоску пятна яркого пурпурного цвета. В качестве контроля специфичности теста на полоску в другом месте наносили каплю раствора лизоцима (1 мг/мл). Поскольку лизоцим не содержит ДОФА или ДОФА-хинона, пятно лизоцима не окрашивается.

Определение адгезионной прочности методом сдвига

Адгезионную прочность определяли по прочности клеевого соединения методом сдвига (lap shear test). В качестве склеиваемых образцов для измерения интенсивности адгезии использовали пластины (т.н. адгеренты) из стекла или пластика одинаковой ширины (~2 см). Для склеивания адгерентов наносили адгезивы, в том числе рекомбинантный адгезивный белок, на поверхности адгерентов у их концов и накладывали адгеренты друг на друга «внахлестку» (т.е. так, чтобы обработанные клеем поверхности перекрывались). При этом площадь клеевого соединения равна произведению ширины адгерентов на длину перекрывания. В тестах в качестве экспериментального адгезива использовали белок Fr-131, в качестве контроля использовали бычий сывороточный альбумин (BSA) или лизоцим.

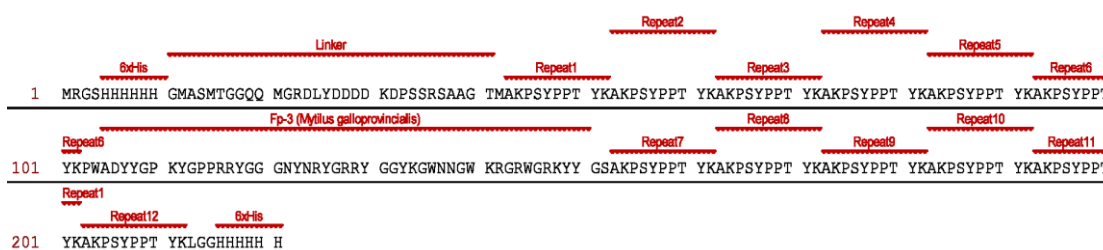
Тест проводили следующим образом. Для обезжиривания адгеренты погружали в раствор щёлочи (2М NaOH) на 2 мин. Обезжиренные поверхности хорошо промывали дистиллированной водой и высушивали досуха на воздухе. На каждую из склеиваемых поверхностей наносили одну каплю (10 мкл) 5% уксусной кислоты. В каждой капле размещивали по 2,5 мг белка (лиофилизированного адгезивного белка или сухого BSA) и шпательем распределяли полученную эмульсию белка в виде равномерного тонкого слоя. Так адгезив распределяли по поверхности каждого адгерента, у его края. Адгеренты располагали так, чтобы можно было прижать намазанные клеем поверхности друг к другу и площадь контакта составила ~2 см². Адгеренты прижимали друг к другу обработанными адгезивом поверхностями (для сжатия использовали фотозажим). Таким образом, в области контакта адгерентов находится 5 мг белка, равномерно распределённого по площади контакта. Собранный «пакет» из двух склеенных адгерентов выдерживали на воздухе, в термостате при 37°C в течение 3 ч. При использовании в качестве адгезива белка Fr-131, после снятия фотозажима два адгерента оказываются весьма прочно склеенными друг с другом. Один адгерент подвешивали свободным

концом к прочно закреплённому подвесу. Ко второму адгеренту на свободный конец подвешивали грузы известной массы. При такой нагрузке усилие, разрывающее клеевое соединение, имеет характер сдвига. Величина разрушающей нагрузки характеризует адгезивные свойства клея. Адгезионную прочность вычисляли как отношение силы тяжести подвешенного груза (в ньютонах, [Н]) на площадь клеевого соединения (в квадратных метрах [м²]) и выражали в мегапаскалях [МПа].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конструкция для экспрессии адгезивного белка Fp-131

Рекомбинантный белок Fp-131 в отличие от адгезивных белков, выделенных их природных источников, демонстрирует хорошую растворимость в воде и водных растворах при нейтральном pH [19]. Белок Fp-131 имеет на N- и C-концах тандемные повторы мотива из 10-ти аминокислотных остатков (AKPSYPPTYK), которые происходят из аминокислотной последовательности адгезивного белка мидий MFP-1. В структуре Fp-131 всего 6 повторов на N-конце и 6 повторов на C-конце. Центральная часть Fp-131 представляет собой последовательность белка MFP-3 (рис. 2).



Аминокислотная последовательность белка Fp-131. Над последовательностью показаны повторы декапептида, происходящего из последовательности белка MFP-1 (обозначены Repeat). В структуре Fp-131 всего 12 тандемных повторов. Центральная часть Fp-131 на протяжении 46 а.о. гомологична последовательности адгезивного белка мидий MFP-3. Показаны положения двух гексагистидиновых меток (6xHis) и линкер, происходящий из экспрессионного вектора

Рис. 2. Карта мотивов белка Fp-131

Amino acid sequence of protein Fp-131. Above the sequence are depicted sequence repeats of a decapeptide motif derived from the mussel adhesive protein MFP-1 (labeled "Repeat"). The Fp-131 has 12 such repeats. The central part of the Fp-131 is homologous to 46 amino acids-long sequence of mussel adhesive protein MFP-3. Also shown above the sequence are positions of two hexahistidine tags (6xHis) and a linker derived from expression vector

Fig. 2. Map of motifs in protein Fp-131

На концах продукта экспрессии присутствуют последовательности из шести остатков гистидина (гексагистидиновые метки), которые введены для того, чтобы очищать продукт с использованием металлоаффинной хроматографии. В составе рекомбинантного белка присутствует аминокислотный линкер, закодированный в полилинкере экспрессионного вектора pRSET B. Аминокислотный линкер был намеренно сохранён в последовательности продукта экспрессии для того, чтобы увеличить расстояние между повторами декапептида и N-концевой гексагистидиновой меткой и ослабить взаимное влияние пространственных укладок указанных мотивов друг на друга. Мы предположили, что наличие линкера может улучшить адсорбцию белка на колонку и облегчить очистку. В опубликованной литературе, где описан аналогичный по молекулярной организации адгезивный белок Fp-151, указывается, что продукт экспрессии, несущий только одну C-концевую метку 6xHis, адсорбируется на металлоаффинный сорбент с низкой эффективностью [20]. Расчётная молекулярная масса рекомбинантного белка Fp-131 – 25,3 кДа.

Последовательность гена Fp-131 была рассчитана так, что состав кодонов оптимален для экспрессии в *E.coli*. Соответствующий фрагмент ДНК был собран *de novo* из синтетических олигонуклеотидов и клонирован в вектор pGEM-T. В полученных клонах были отсекарованы вставки отобранные плазмиды, несущие целевой ген безошибок. Ген Fp-131 имеет на концах сайты рестрикции NcoI и HindIII, которые были использованы для встройки гена в экспрессионную плазмиду pET28с. Генетическая карта экспрессионной плазмиды Alt18.pET28-Fp-131 представлена на рисунке 3.

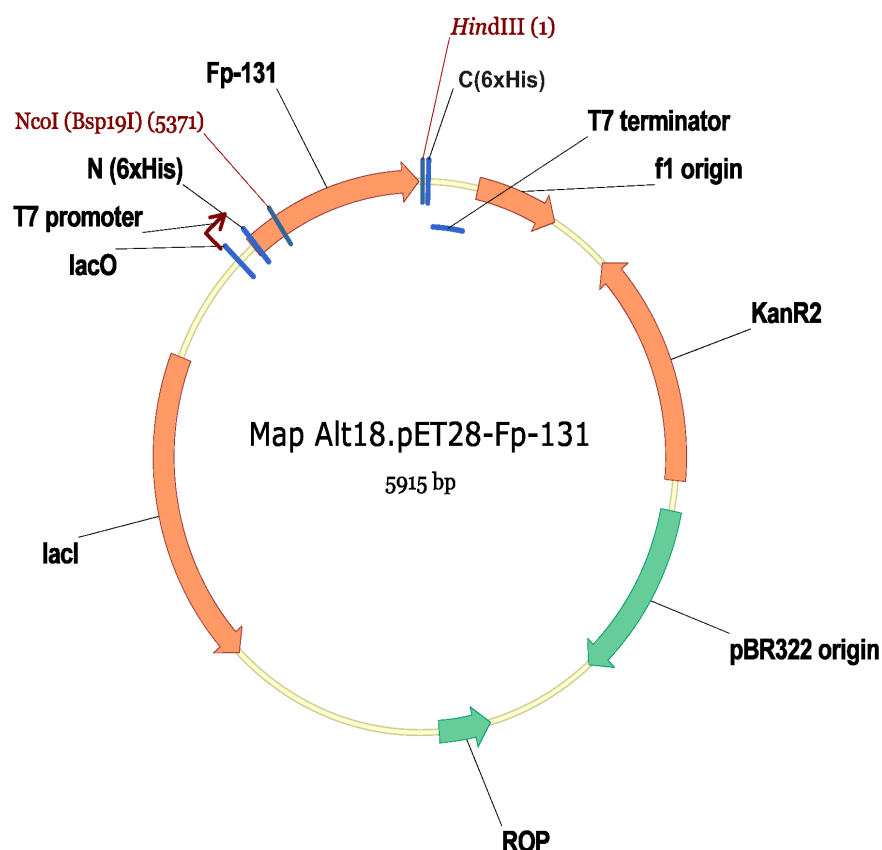


Рис. 3. Генетическая карта плазмиды Alt18.pET28-Fp-131

Fig. 3. Genetic map of plasmid Alt18.pET28-Fp-131

В плазмиде Alt18.pET28-Fp-131 ген Fp-131 находится под контролем промотора РНК-полимеразы фага Т7. Для того, чтобы в бактериальной системе экспрессии происходили транскрипция мРНК с гена Fp-131 и трансляция целевого белка, необходимо, чтобы экспрессионный штамм синтезировал РНК-полимеразу фага Т7. Используемый нами для белковой экспрессии штамм *E. coli* BL21(DE3) синтезирует РНК-полимеразу фага Т7 в присутствии химического индуктора (IPTG). От исходного вектора рЕТ28с экспрессионная конструкция Alt18.pET28-Fp-131 унаследовала маркер устойчивости к канамицину и область начала репликации (origin) типа pBR322 Ori.

Конструкция для экспрессии рекомбинантной тирозиназы

Для того, чтобы придать белку Fp-131 адгезивные свойства, определенная доля остатков Туг в составе Fp-131 должна быть превращена востатки ДОФА. В природе такая модификация осуществляется ферментом тирозиназой. Опубликована работа, в которой конверсия остатков Туг в ДОФА в адгезивном белке Fp-151 проведена *in vivo*, посредством совместной экспрессии Fp-151 и тирозиназы в бактериальных клетках [20]. В работе [20] использовали рекомбинантную тирозиназу *Streptomyces antibioticus*. Тирозиназа *Str. antibioticus* неудобна для создания систем совместной экспрессии потому, что данный фермент синтезируется в каталитически неактивной форме (эта форма не имеет в активном центре атомов меди Cu²⁺). Для загрузки ионов меди в активный центр тирозиназы *Str. antibioticus* требуется взаимодействие новосинтезированной тирозиназы с ещё одним белком, который называется «медный шаперон» (т.н. «caddie protein», продукт экспрессии с гена ORF378). Для целей данной работы потребность в медном шапероне означает необходимость производить в одной бактериальной клетке три рекомбинантных белка: адгезивный белок Fp-131 – субстрат для тирозиназы, тирозиназу *Str. antibioticus* и медный шаперон.

Для конверсии остатков Туг в ДОФА в белке Fp-131 мы использовали другую тирозиназу, которая была впервые описана у бактерии *V. spinosum*. Рекомбинантная тирозиназа *V. spinosum* производится в каталитически активной форме в *E. coli* в условиях инкубации в обычных средах для выращивания энтеробактерий. Активный центр тирозиназы *V. spinosum* оказывается способен эффективно захватывать ионы меди, присутствующие в следовых количествах в обычных средах для выращивания *E. coli* (таких как LB или TB) [21]. Для получения рекомбинантной тирозиназы *V. spinosum* в каталитически активной форме не требуется экспрессировать никакие шапероны. Аминокислотная последовательность тирозиназы *V. spinosum* показана на рисунке 4.

1 MAKYHRLNLQ NFAAAPFLES YKKAITVMLQ LPPSDARNWY RNAFIHTLDC PHGNWVFWV HRGYTGWFER TVRELSGDPN FAPPYWDWTA LPQVPDSFFN
 101 GVLDPNPFAF IASYNEFYSQ LSNPMSALWN SFSTAQLQQM RNRGFQSVND VVQAVRDSM FPRGRARTL TRQNPFGDAT TRRAVSIGTI RNALPTDFI
 201 TFGSGKTANH SESATQGILE SQPHNVHNN IGGFMQDLLS PTDPVFFAHH SNIDRLWDVW TRKQQRIGLP TLPTGANLPL WANEPFLFFI GPDGKPVAKN
 301 KAGDYATIGD FEYNYEPGSG EAV

Рис. 4. Аминокислотная последовательность тирозиназы *V. spinosum*

Fig. 4. Amino acid sequence of *V. spinosum* tyrosinase

В последовательности тирозиназы, экспрессируемой с синтетического гена, нет аффинных меток для металлоаффинной хроматографии. Это позволяет отделить целевой продукт (Fp-131) от рекомбинантной тирозиназы, которая, как и Fp-131, производится в клетках штамма-производителя в значительных количествах. Расчётная молекулярная масса рекомбинантной тирозиназы – 36,6 кДа.

Ген тирозиназы был синтезирован *de novo*. После подтверждения правильности сборки секвенированием ген тирозиназы был встроен в экспрессионный вектор pRSET B по сайтам NcoI и HindIII. Карта плазмиды Alt17.pRSET-Tyr представлена на рисунке 5.

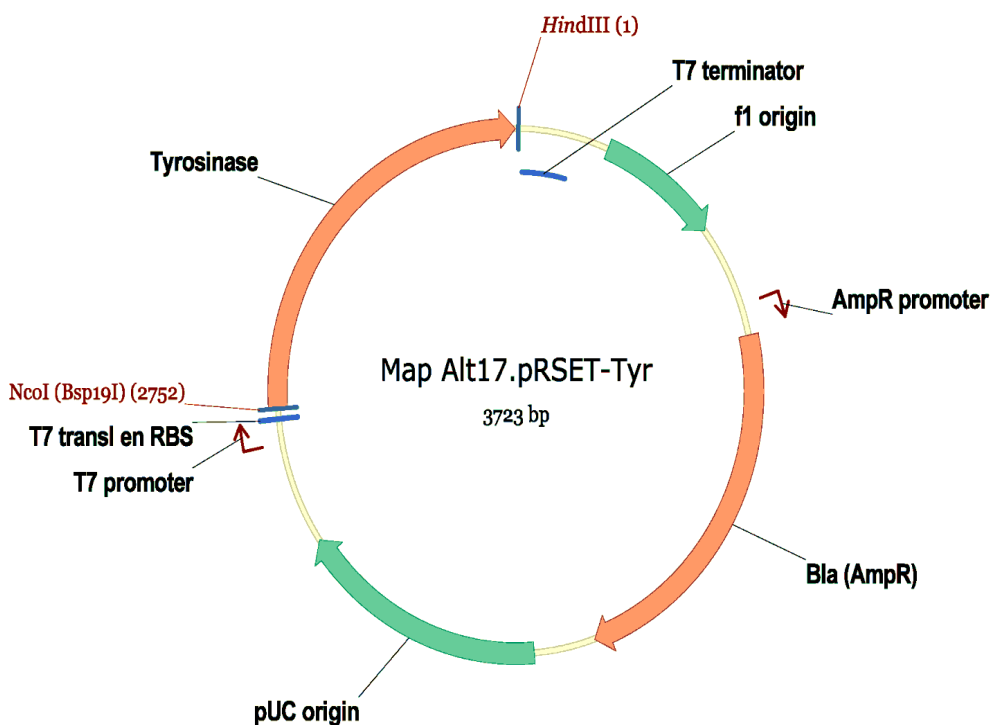


Рис. 5. Генетическая карта плазмиды Alt17.pRSET-Tyr

Fig. 5. Genetic map of plasmid Alt17.pRSET-Tyr

В плазмиде Alt17.pRSET-Tyr ген тирозиназы находится под контролем промотора РНК-полимеразы Т7, что позволяет экспрессировать рекомбинантный белок в штамме BL21(DE3). От исходного вектора pRSET B экспрессионная конструкция Alt17.pRSET-Tyr унаследовала маркер устойчивости к ампициллину и область начала репликации типа pUC Ori.

Получение штамма-производителя рекомбинантного адгезивного белка Fp-131

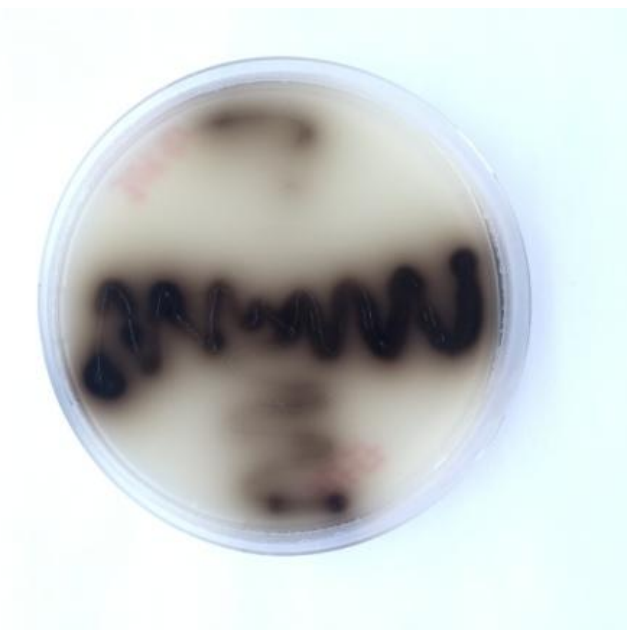
Клетки штамма BL21(DE3) электропорировали смесью ДНК плазмид Alt18.pET28-Fp-131 и Alt17.pRSET-Tyr. После высева трансформантов на агаризованную среду, содержащую ампициллин и канамицин, были получены в большом количестве клоны, демонстрирующие устойчивость к обоим антибиотикам. Созданный штамм-производитель обозначен BL21(DE3)/Alt17+Alt18.

Плазмиды Alt18.pET28-Fp-131 и Alt17.pRSET-Tyr имеют разные области начала репликации (Ori), и эти две плазмиды относятся к разным группам несовместимости (т.е. могут реплицироваться в одной и той же бактериальной клетке). Плазмиды Alt18.pET28-Fp-131 и Alt17.pRSET-Tyr кодируют разные маркеры резистентности, и после трансформации бактериальных клеток смесью плазмид выросли клоны с двойной резистентностью. Большой выход клонов «двойного» трансформанта (>1000 клонов выросли после трансформации смесью, содержащей по 10 нг каждой плазмиды) показывает отсутствие интерференции репликации двух плазмид. В каждой клетке штамма-производителя в условиях индукции экспрессии

происходит синтез двух рекомбинантных белков (Fr-131 и тирозиназы). В условиях коэкспрессии с Fr-131 тирозиназа гидроксилирует остатки Туг в последовательности Fr-131 и превращает их в остатки ДОФА [20].

Демонстрация активности тирозиназы, синтезирующейся в клетках штамма-продуцента

Штамм-продуцент BL21(DE3)/A1t17+A1t18 высевали на поверхность индикаторной среды, которая чернеет под воздействием тирозиназы. Индикаторная среда содержит тирозин (10 г/л). В присутствии индуктора IPTG в клетках штамма-продуцента синтезируется рекомбинантная тирозиназа. Тирозиназа при участии кислорода воздуха осуществляет окисление тирозина до ДОФА и ДОФА-хинона. Далее происходят быстрые неферментативные реакции по цепочке ДОФА-хинон -> ДОФАхром -> эумеланин -> меланин (чёрный пигмент) [22]. Почернение среды вокруг колоний доказывает продукцию в бактериальных клетках каталитически активной тирозиназы. Фотография чашки Петри с индикаторной средой и засеянным на неё штаммом-продуцентом приведена на рисунке 6.



Штамм-продуцент производит каталитически активную тирозиназу, которая приводит к почернению индикаторной среды вокруг колоний

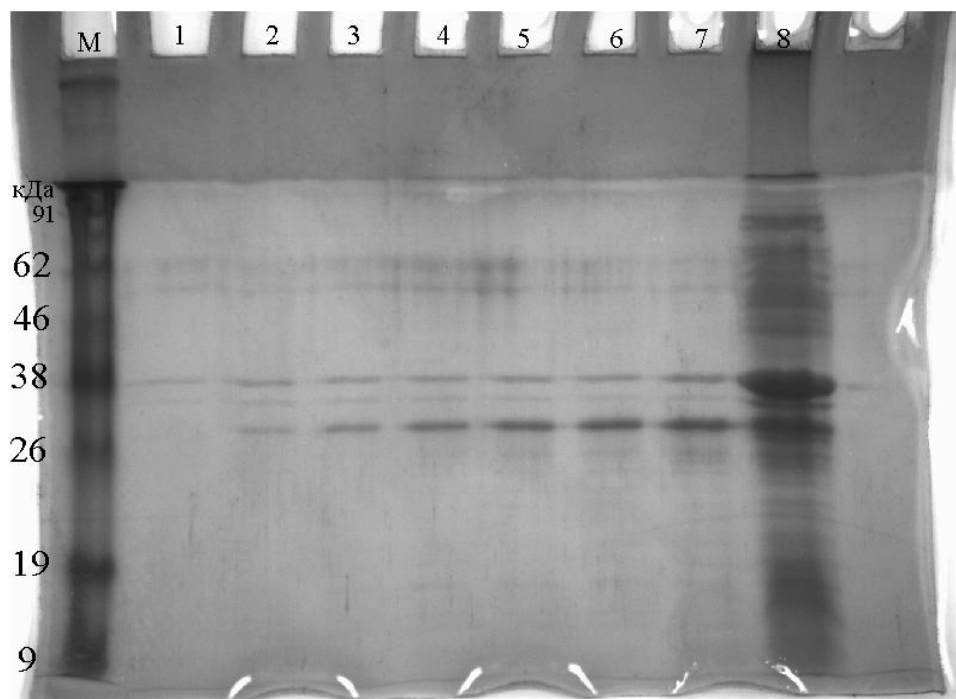
Рис. 6. Демонстрация активности тирозиназы

Bacterial cells produce catalytically active tyrosinase which activity results in blackening of the medium around colonies

Fig. 6. Demonstration of activity of tyrosinase

Анализ продукции рекомбинантного белка Fr-131 в культурах малого объёма

Временную динамику накопления белков в клетках штамма-продуцента BL21(DE3)/A1t17+A1t18 исследовали путём индукции экспрессии в культуре объёмом 100 мл. После добавления к культуре химического индуктора IPTG, через определённые временные интервалы (1, 2, 3, 4, 5 и 6 ч, а также после инкубации в течение ночи) отбирали пробы культуры и исследовали белковый состав клеток гелем-электрофорезом в денатурирующих условиях (SDS-PAGE). Результаты данного эксперимента представлены на рисунке 7.



Дорожка 1 – до добавления IPTG; дорожки 2-8– после добавления IPTG (дорожки 2-7– пробы «1 ч», «2 ч», «3 ч», «4 ч», «5 ч» и «6 ч»); дорожка 8 – проба после инкубации в течение ночи; дорожка М– маркер Bluestep Broad Range Marker (Amresco)

Рис. 7. Накопление рекомбинантных белков –Fp-131 и тирозиназы– в клетках штамма-продуцента

Lane 1 – before addition of IPTG; lanes 2-8 – after addition of IPTG (lanes 2-7 – samples of culture collected 1h, 2h, 3h, 4h, 5h and 6h post induction); lane 8 – sample collected after overnight incubation; lane M – marker Bluestep Broad Range Marker (Amresco)

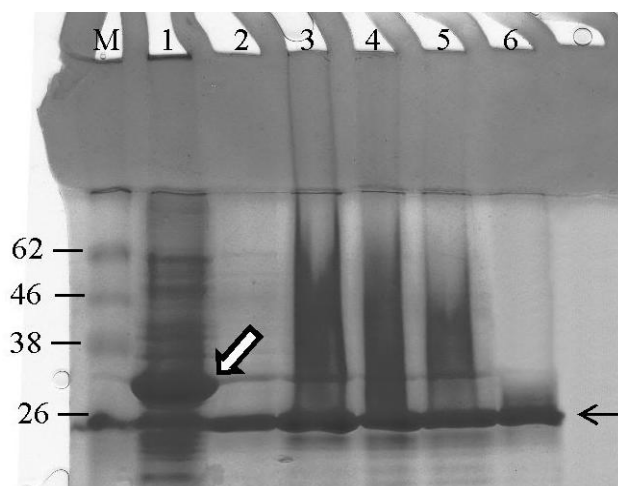
Fig. 7. Accumulation of the recombinant proteins – Fp-131 and tyrosinase – in bacterial cells

В культуре происходит накопление двух продуктов с наблюдаемыми молекулярными массами (M_w) – 26-28 кДа и 38 кДа. Бенд с видимой M_w – 26-28 кДа может представлять собой целевой продукт – рекомбинантный адгезивный белок Fp-131 (расчётная M_w 25,3 кДа). В данном эксперименте отличие наблюдаемой M_w от расчётной M_w для белка Fp-131 может быть объяснено тем, что данный белок имеет мотивы, третичные структуры которых устойчивы в денатурирующих условиях в ходе электрофореза SDS-PAGE. Такие устойчивые третичные структуры могут снижать подвижность белка в геле. Меньшая по сравнению с ожидаемой подвижность рекомбинантных адгезивных белков в ходе SDS-PAGE описана [16]. Бенд с видимой M_w 38 кДа хорошо соответствует по подвижности рекомбинантной тирозиназе (расчётная M_w 36,6 кДа).

Выделение рекомбинантного белка Fp-131

В ходе наработки культуры штамма-продуцента BL21(DE3)/Alt17+Alt18 в большом объёме среды (1л) мы обнаружили, что большая часть целевого продукта экспрессии накапливается в тельцах включения, которые после лизиса клеток отделяются в нерастворимую фракцию (данные не показаны). Из культуры в среде ТВ объёмом 1 л получали 6 г биомассы клеток штамма-продуцента. После лизиса бактериальных клеток центрифугированием отделяли нерастворимую фракцию лизата, содержащую тельца включения и клеточный дебрис (остатки клеточных стенок бактерий, липиды и пр.). Данный осадок практически полностью растворялся в 10 мл буфера, содержащего 8М мочевины. Белки адсорбировали из раствора, содержащего 8М мочевины, на колонку HiTrap Chelating 5 ml (GE Healthcare). Даная колонка содержит 5 мл сорбента для металлоаффинной хроматографии с заявленной производителем сорбционной ёмкостью ~12 мг белка (меченного гексагистиридиновой меткой) на 1 мл сорбента. Для хроматографии использовали буферы с добавлением мочевины до 8М. В ходе элюции белков с колонки градиентом имидазола наблюдали выход белка в один хроматографический пик, который распределялся в 4 фракции (каждая фракция по 5 мл). Фракции, соответствующие хроматографическому пику, объединяли и к полученному раствору добавляли уксусную кислоту до 25% (v/v). Подкисленный раствор белка диализовали сначала против 1% уксусной кислоты и затем против воды. Собранный из диализного мешка раствор высушивали на лиофильной сушилке. В результате получили препарат белка в виде рыхлого и волокнистого комка белого цвета. Масса белка, полученного в данном эксперименте, составила 25,2 мг. Анализ полученного белка методом SDS-PAGE показал, что белок движется в денатурирующем геле как один бенд с видимой молекулярной массой

~26 кДа и, таким образом, наиболее вероятно представляет собой рекомбинантный белок Fp-131. Рекомбинантный адгезивный белок Fp-131 присутствует в препарате с высокой чистотой (>90%) (рис. 8).



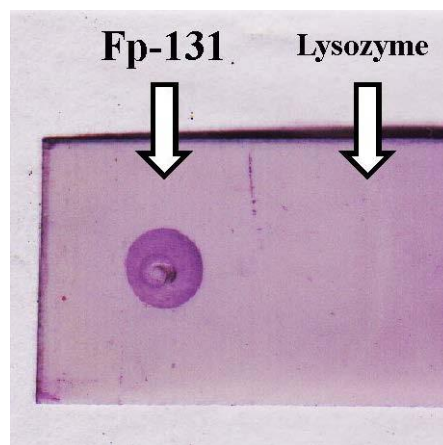
Дорожки: 1 – лизат клеток штамма-продуцента после отделения телец включения; 2-5 –четыре фракции, соответствующие хроматографическому пику в ходе элюции белка с колонки градиентом имидазола; 6 – проба, приготовленная путём растворения 2,5 мкг лиофилизованного очищенного белка в 12 мкл буфера HN (на дорожку нанесено 2,5 мкг белка); М – маркер Bluestep Broad Range Marker (Amresco). Двойная стрелка указывает на бенд тирозиназы (Mw 36,6 кДа), которая присутствует в растворимой фракции лизата клеток штамма-продуцента. Одинарная стрелка указывает на бенд белка Fp-131 (Mw 25,3кДа)

Рис. 8. Результаты препаративного выделения белка Fp-131

Lanes: 1 – lysate of bacterial cells after the separation of inclusion bodies; 2-5 –four fractions corresponding to chromatographic peak during elution of protein from the column; 6 – sample, prepared by dissolving of 2.5 ug of lyophilized protein in 12 ul of HN buffer (2.5 ug of protein are loaded on the lane); M – marker Bluestep Broad Range Marker (Amresco). Double arrow points to band of the tyrosinase (Mw 36,6kDa), which is present in high amounts in the soluble fraction of the bacterial lysate. Single arrow points to band of the Fp-131 protein (Mw 25,3kDa)

Fig. 8. Purification of the Fp-131 protein

В белке Fp-131 присутствуют катехолы или хиноны – продукты модификации остатков Туг тирозиназой. Воздействие тирозиназы на остатки Туг приводит к превращению Туг в ДОФА, который далее окисляется в соответствующий хинон (ДОФА-хинон). Белки, содержащие хиноны, называются хинопротеинами. В природе есть примеры хинопротеинов, кроме адгезивных белков [23]. Существует простой тест для обнаружения хинопротеинов, основанный на том, что в присутствии катехолов (например, ДОФА) или хинонов происходит восстановление тетразолов (например, NBT) в щелочном растворе, содержащем глицин [18]. Лиофилизированный белок Fp-131 растворяли в воде до концентрации 1 мг/мл и наносили каплю полученного раствора на нитроцеллюлозную мембрану, которую погружали в раствор NBT. В месте нанесения белка Fp-131 появляется пурпурное пятно (рис. 9).



Пурпурное пятно на мембране образовалось в результате реакции NBT с ДОФА или ДОФА-хиноном в молекуле белка Fp-131, экспрессированного в присутствии тирозиназы. Контрольный белок (лизоцим) не содержит катехолов и хинонов и не реагирует с NBT

Рис. 9. Демонстрация модификации остатков Туг в белке Fp-131 под воздействием тирозиназы

Purple spot on the membrane develops because of the reaction between NBT and DOPA or DOPA-quinone. The DOPA is present in the Fp-131 molecules expressed in the presence of tyrosinase. Control protein (lysozyme) not containing catechols and quinines does not react with the NBT

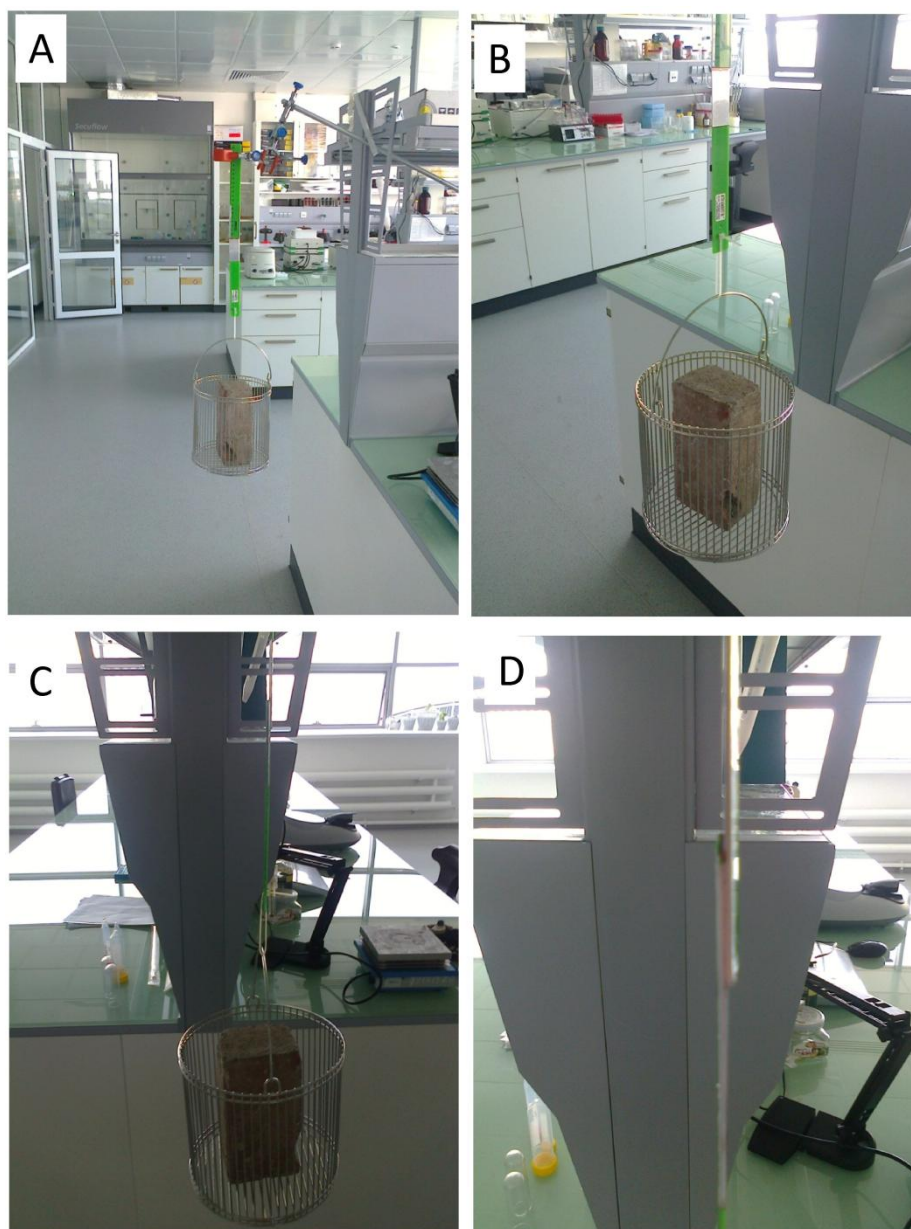
Fig. 9. Tyrosinase-modified Tyr is present in the Fp-131

Реакция с NBT доказывает, что в белке Fp-131 присутствуют продукты гидроксирования остатков Туг, т.е. посттрансляционные модификации, которые обеспечивают данному белку адгезивные свойства. Для контроля специфичности теста на эту же полоску нитроцеллюлозы в другом месте наносили лизоцим, пятно которого осталось неокрашенным.

В опубликованной литературе высказывается мнение, что остатки ДОФА в адгезивных белках мидий образуются из остатков Туг под воздействием полифенолоксидазы [3]. Полифенолоксидазы катализируют оксигидроксилирование монофенолов до орто-дифенолов (катехолов), а также катализируют вторую реакцию – дегидрирование катехолов до орто-хинонов. В MFP, выделенных из природных источников, присутствуют только остатки ДОФА, но не хиноны. Высказано предположение, что когда мидия создаёт прикрепительный диск и формирует биссусную нить, окислению ДОФА в адгезивных белках препятствуют антиоксиданты, вырабатываемые моллюском [24].

Адгезионная прочность белка Fp-131

Адгезионную прочность соединения, склеенного белком Fp-131, измеряли путём склеивания пластин-адгерентов, с последующим проведением теста на разрыв клеевого соединения методом сдвига. Адгеренты сделаны следующим образом: на плоские поверхности двух линеек шириной 2,2 см наклеивали полосы алюминиевой фольги (для наклеивания фольги на пластик использовали цианоакрилатный клей), обращали внимание на то, чтобы сохранить чистыми свободные поверхности фольги. Свободные поверхности листов фольги обезжиривали, погружая на 1 мин в 2М NaOH и на 5 мин в дистиллированную воду. Адгеренты высушивали на воздухе до полного высыхания поверхностей. На зачищенную алюминиевую поверхность каждого адгерента, у края, наносили одну каплю (10 мкл) 5% уксусной кислоты и в каждую каплю вносили 2,5 мг лиофилизированного белка Fp-131. Белок растворяли в капле и распределяли полученный раствор по поверхности адгерента, в прямоугольнике со сторонами 2,2x1 см. Намазанный клеем конец одного адгерента накладывали на покрытый клеем конец другого адгерента и прижимали пластины друг к другу зажимом. В полученном «пакете» адгеренты склеены «внахлест». Площадь клеевого соединения составила 2,2 кв.см. Пакет из склеенных адгерентов инкубировали при 37°C в течение 3 ч. Далее пакет закрепляли на подвесе за свободный конец одного адгерента, а к свободному концу второго адгерента подвешивали лёгкую прочную корзину, в которую помещали грузы известной массы (рис.10).



Каждый адгерент представляет собой линейку, на конце которой закреплена полоска из алюминиевой фольги. Свободные поверхности алюминиевой фольги использованы для склеивания адгерентов друг с другом. Панель А– общий вид подвешенного «пакета» адгерентов с грузом; панель В– то же, что и на панели А (видны выступающие части алюминиевых пластин);панель С– то же, что и на панели А (вид сбоку);панель D– вид на клеевый шов

Рис. 10. Установка для измерения адгезионной прочности

Each adherend is a ruler with a strip of aluminum foil attached to one end. Free surface of the aluminum foil were used to glue the adherends to each other using the recombinant adhesive protein Fp-131 as a glue. Panel A – general view on the assembly of two adherends glued to each other;panel B – same as in Panel A (aluminium surface is visible);panel C – same as in Panel A, view the side;panel D –enlarged view of the glued contact between the adherends

Fig. 10. Apparatus for measuring of the adhesion strength

Нагрузку увеличивали до разрыва соединения. Прочность на сдвиг вычисляли как отношение силы тяжести груза к площади клеевого соединения (прочность на сдвиг имеет размерность давления и выражается в МПа). Разрыв клеевого соединения площадью 2 кв.см произошёл после подвешивания массы 25,6 кг, что соответствует прочности на сдвиг 1,1 МПа. Это практически значимая адгезионная прочность, она, например, превосходит силу адгезии на сдвиг коммерческого фибринового клея TISSEEL (9 кПа) [25]. Различные препараты природных MFP, выделенных из биссуса мидий, демонстрируют адгезионную прочность при сдвиге в диапазоне 0,3-2 МПа [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной статье описана технология получения рекомбинантного адгезивного белка, не идентичного по аминокислотной последовательности природным MFP, но имеющего такие же домены, как у известных своими адгезивными свойствами белков мидий MFP-1 и MFP-3. Рекомбинантный белок Fp-131 производится в *E. coli* и приобретает необходимые посттрансляционные модификации (превращение тирозина в ДОФА) в результате коэкспрессии с рекомбинантной тирозиназой. Адгезионная прочность Fp-131 сравнима с таковой у природных прототипов. Описанная в статье технология имеет перспективы использования для производства биосовместимых клеев для медицины, ортодонтии и клеточной инженерии.

Финансирование

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки Республики Казахстан №0115PK01798 «Биоадгезивные микрочастицы, выделяющие антимикробные пептиды – новый препарат для профилактики и лечения кариеса».

ЛИТЕРАТУРА

1. Stewart R.J., Ransom T.C., Hlady V.J. Natural Underwater Adhesives // *PolymSci B Polym Phys.* – 2011. – Vol. 11, №49. – P. 757-771.
2. Lee B.P., Messersmith P.B., Israelachvili J.N., Waite J.H. Mussel-Inspired Adhesives and Coatings // *Annu Rev Mater Res.* – 2011. – Vol. 41, №1. – P. 99-132.
3. Silverman H.G., Roberto F.F. Understanding marine mussel adhesion // *Mar Biotechnol (NY).* – 2007. – Vol. 6, №9. – P. 661-681.
4. Jonker J.L., Abram F., Pires E., Varela Coelho A., Grunwald I. Adhesive proteins of stalked and acorn barnacles display homology with low sequence similarities // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 10, №8-9. – P. 108-122.
5. Stewart R.J., Wang C.S., Song I.T., Jones J.P. The role of coacervation and phase transitions in the sandcastle worm adhesive system // *Adv Colloid Interface Sci.* – 2016. – Vol. S0001. – P. 8686-8699.
6. Hatano T., Nagashima T. The Secretion Process of Liquid Silk with Nanopillar Structures from *Stenopsychemarmorata* (Trichoptera: Stenopsychidae) // *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 5, №9237. – P. 1010-1038.
7. Lin Q., Gourdon D., Sun C., Holten-Andersen N., et al. Adhesion mechanisms of the mussel foot proteins mfp-1 and mfp-3 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 10. – P. 3782-3786.
8. Clancy S.K., Sodano A., Cunningham D.J., et al. Marine Bioinspired Underwater Contact Adhesion // *Biomacromolecules.* – 2016. – Vol. 5, №17. – P. 1869-1874.
9. Li A., Mu Y., Jiang W., Wan X. A mussel-inspired adhesive with stronger bonding strength under underwater conditions than under dry conditions // *ChemCommun (Camb).* – 2015. – Vol. 44, №51. – P. 9117-9120.
10. Lu Q., Danner E., Waite J.H., et al. Adhesion of mussel foot proteins to different substrate surfaces // *JR Soc Interface.* – 2013. – Vol. 79, №10. – P. 2641-2659.
11. Yu J., Kan Y., Rapp M., Danner E., et al. Adaptive hydrophobic and hydrophilic interactions of mussel foot proteins with organic thin films // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 39, №110. – P. 15680-15685.
12. Yu J., Wei W., Menyo M.S., et al. Adhesion of mussel foot protein-3 to TiO₂ surfaces: the effect of pH // *Biomacromolecules.* – 2013. – Vol. 4, №14. – P. 1072-1077.
13. Haemers S., Koper G.J., Frens G. Effect of oxidation rate on cross-linking of mussel adhesive proteins // *Biomacromolecules.* – 2003. – Vol. 3, №4. – P. 632-640.
14. Monahan J., Wilker J.J. Cross-linking the protein precursor of marine mussel adhesives: bulk measurements and reagents for curing // *Langmuir.* – 2004. – Vol. 9, №20. – P. 3724-3729.
15. Krishnan V., Clark R., Chekmareva M., et al. In Vivo and Ex Vivo Approaches to Study Ovarian Cancer Metastatic Colonization of Milky Spot Structures in Peritoneal Adipose // *J Vis Exp.* – 2015. – Vol. 105. – P. 52-72.
16. Hwang D.S., Yoo H.J., Jun J.H., et al. Expression of functional recombinant mussel adhesive protein Mgf-5 in *Escherichia coli* // *Appl Environ Microbiol.* – 2004. – Vol. 6, №70. – P. 3352-3359.
17. Hwang D.S., Gim Y., Cha H.J. Expression of functional recombinant mussel adhesive protein type 3A in *Escherichia coli* // *BiotechnolProg.* – 2005. – Vol. 2, №21. – P. 965-970.
18. Briceño A., Muñoz P., Brito P., et al. Aminochrome Toxicity is Mediated by Inhibition of Microtubules Polymerization Through the Formation of Adducts with Tubulin // *Neurotox Res.* – 2016. – Vol. 3, №29. – P. 381-393.
19. Yang B., Kang D.G., Seo J.H., et al. A comparative study on the bulk adhesive strength of the recombinant mussel adhesive protein fp-3 // *Biofouling.* – 2013. – Vol. 5, №29. – P. 483-490.
20. Choi Y.S., Yang Y.J., Yang B., Cha H.J. In vivo modification of tyrosine residues in recombinant mussel adhesive protein by tyrosinase co-expression in *Escherichia coli* // *Microb Cell Fact.* – 2012. – Vol. 11. – P. 139-156.
21. Ren Q., Henes B., Fairhead M., Thöny-Meyer L. High level production of tyrosinase in recombinant *Escherichia coli* // *BMC Biotechnol.* – 2013. – Vol. 13. – P. 18-36.

22. Chang T.S. An updated review of tyrosinase inhibitors // *Int J Mol Sci.* – 2009. – Vol. 10, №6. – P. 2440-2475.
23. Rodgers K.J., Hume P.M., Dunlop R.A., Dean R.T. Biosynthesis and turnover of DOPA-containing proteins by human cells // *Free Radic Biol Med.* – 2004. – Vol. 37, №11. –P. 1756-1764.
24. Nicklisch S.C., Waite J.H. Mini-review: the role of redox in Dopa-mediated marine adhesion // *Biofouling.* – 2012. – Vol. 28, №8. – P. 865-877.
25. Zhou J., Defante A.P., Lin F., et al. Adhesion properties of catechol-based biodegradable amino acid-based poly(ester urea) copolymers inspired from mussel proteins // *Biomacromolecules.* – 2015. – Vol. 16, №1. – P. 266-274.

REFERENCES

1. Stewart R.J., Ransom T.C., Hlady V.J. Natural Underwater Adhesives. *Polym Sci B Polym Phys*, 2011, vol. 11, no. 9, pp. 757-771.
2. Lee B.P., Messersmith P.B., Israelachvili J.N., Waite J.H. Mussel-Inspired Adhesives and Coatings. *Annu Rev Mater Res*, 2011, vol. 41, no. 1, pp. 99-132.
3. Silverman H.G., Roberto F.F. Understanding marine mussel adhesion. *Mar Biotechnol (NY)*, 2007, vol. 6, no. 9, pp. 661-681.
4. Jonker J.L., Abram F., Pires E., Varela Coelho A., Grunwald I. Adhesive proteins of stalked and acorn barnacles display homology with low sequence similarities. *PLoS One*, 2014, vol. 10, no. 8, 9, pp. 108-122.
5. Stewart R.J., Wang C.S., Song I.T., Jones J.P. The role of coacervation and phase transitions in the sandcastle worm adhesive system. *Adv Colloid Interface Sci*, 2016, vol. S0001, pp. 8686-8699.
6. Hatano T., Nagashima T. The Secretion Process of Liquid Silk with Nanopillar Structures from *Stenopsychemarmorata* (Trichoptera: Stenopsychidae). *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5, no. 9237, pp. 1010-1038.
7. Lin Q., Gourdon D., Sun C., et al. Adhesion mechanisms of the mussel foot proteins mfp-1 and mfp-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, vol. 10, pp. 3782-3786.
8. Clancy S.K., Sodano A., Cunningham D.J., et al. Marine Bioinspired Underwater Contact Adhesion. *Biomacromolecules*, 2016, vol. 5, no. 17, pp. 1869-1874.
9. Li A., Mu Y., Jiang W., Wan X. A mussel-inspired adhesive with stronger bonding strength under underwater conditions than under dry conditions. *Chem Commun (Camb)*, 2015, vol. 44, no. 51, pp. 9117-9120.
10. Lu Q., Danner E., Waite J.H., Israelachvili J.N., Zeng H., Hwang D.S. Adhesion of mussel foot proteins to different substrate surfaces. *JR Soc Interface*, 2013, vol. 79, no. 10, pp. 2641-2659.
11. Yu J., Kan Y., Rapp M., et al. Adaptive hydrophobic and hydrophilic interactions of mussel foot proteins with organic thin films. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, vol. 39, no. 110, pp. 15680-15685.
12. Yu J., Wei W., Menyo M.S., et al. Adhesion of mussel foot protein-3 to TiO₂ surfaces: the effect of pH. *Biomacromolecules*, 2013, vol. 4, no. 14, pp. 1072-1077.
13. Haemers S., Koper G.J., Frens G. Effect of oxidation rate on cross-linking of mussel adhesive proteins. *Biomacromolecules*, 2003, vol. 3, no. 4, pp. 632-640.
14. Monahan J., Wilker J.J. Cross-linking the protein precursor of marine mussel adhesives: bulk measurements and reagents for curing. *Langmuir*, 2004, vol. 9, no. 20, pp. 3724-3729.
15. Krishnan V., Clark R., Chekmareva M., et al. In Vivo and Ex Vivo Approaches to Study Ovarian Cancer Metastatic Colonization of Milky Spot Structures in Peritoneal Adipose. *J Vis Exp*, 2015, vol. 105, pp. 52-72.
16. Hwang D.S., Yoo H.J., Jun J.H., et al. Expression of functional recombinant mussel adhesive protein Mgf-5 in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, vol. 6, no. 70, pp. 3352-3359.
17. Hwang D.S., Gim Y., Cha H.J. Expression of functional recombinant mussel adhesive protein type 3A in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 2005, vol. 2, no. 21, pp. 965-970.
18. Briceño A., Muñoz P., Brito P., et al. Aminochrome Toxicity is Mediated by Inhibition of Microtubules Polymerization Through the Formation of Adducts with Tubulin. *Neurotox Res*, 2016, vol. 3, no. 29, pp. 381-393.
19. Yang B., Kang D.G., Seo J.H., et al. A comparative study on the bulk adhesive strength of the recombinant mussel adhesive protein fp-3. *Biofouling*, 2013, vol. 5, no. 29, pp. 483-490.
20. Choi Y.S., Yang Y.J., Yang B., Cha H.J. In vivo modification of tyrosine residues in recombinant mussel adhesive protein by tyrosinase co-expression in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2012, vol. 11, pp. 139-156.
21. Ren Q., Henes B., Fairhead M., Thöny-Meyer L. High level production of tyrosinase in recombinant *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol*, 2013, vol. 13, pp. 18-36.
22. Chang T.S. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci*, 2009, vol. 10, no. 6, pp. 2440-2475.
23. Rodgers K.J., Hume P.M., Dunlop R.A., Dean R.T. Biosynthesis and turnover of DOPA-containing proteins by human cells. *Free Radic Biol Med*, 2004, vol. 37, no. 11, pp. 1756-1764.
24. Nicklisch S.C., Waite J.H. Mini-review: the role of redox in Dopa-mediated marine adhesion. *Biofouling*, 2012, vol. 28, no. 8, pp. 865-877.
25. Zhou J., Defante A.P., Lin F., et al. Adhesion properties of catechol-based biodegradable amino acid-based poly(ester urea) copolymers inspired from mussel proteins. *Biomacromolecules*, 2015, vol. 16, no. 1, pp. 266-274.

ЖАҢА МАТЕРИАЛ: БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ МЕДИЦИНАДА ҚОЛДАНЫЛАТЫН БИОҮЙЛЕСІМДІ МИДИЯНЫҢ РЕКОМБИНАНТТЫ ЖАБЫСҚАҚ АҚУЫЗЫ

Ақсамбаева А.С.¹, Шағырова Ж.С.¹, Нұрғожин Т.С.², Жиенбай Е.², Шустов А.В.¹

¹Ұлттық биотехнология орталығы

Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана, 010000, Қазақстан

²Назарбаев Университеті

Қабанбай батыр д-лы, 53, Астана, 010000, Қазақстан

altyn-ai@bk.ru

ТҮЙІН

Мидияның жабысқақ ақуыздары (MFP) ұлу өсетін субстратқа мидиялардың бекітілуін қамтамасыз етеді. Табиғи MFP, мидиялардың бисусты жіптеріндегі жабысқан дисктерінде бар болып табылады және медицина, ортодонтия, клеткалық және тіндік инженерияда қолдануға жақсы желімдік қасиетті көрсетеді. MFP әр түрлі табиғи және жасанды материалдарды желімдей алады. Медицинада пайдалану үшін MFP суға төзімді желім болғаны сумен тұрақты байланыста болатын беттерді желімдеуде маңызды болып табылады. Табиғи MFP желім ретінде қолданылады, бірақ қолдану аясы табиғи көздерден MFP алудың қиын болуынан шектеулі.

Рекомбинантты MFP табиғи үлгісіне тартымды балама болып табылады, себебі олар жоғары шығыспен өндірілуі мүмкін. *E.coli*-де өндірілген рекомбинантты MFP, жабысқақ қасиеттерге ие болу үшін, тирозин қалдықтарын 3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА) қалдықтарына постмодификациясын қамтамасыз ету үшін қажет.

Бұл мақалада жабысқақ ақуызды өндіретін рекомбинантты Fp-131 гендік-инженерлік жүйесі және жаңадан синтезделген полипептидтік тирозин қалдықтары ДОФА-ға өзгертілуі сипатталған. Тирозин Fp-131 бірге тирозиназа әсерінен бактериялық жасушаларда *in vivo* коэкспрессияланып, гидроксилденуі жүзеге асады. Әртүрлі *Ogi* репликациялары және резистенттілік маркерлермен екі түрлі плазмида ақуыздарының экспрессиясы арқылы тирозин және Fp-131 коэкспрессиясы жүзеге асырылды.

Fp-131 ақуызы денатурациялаушы жағдайда металлоаффинді хроматография көмегімен тазартылды. Диализ және лиофильді кептіруден соң 1 литр индукцияленген мәдениеттен 25 мг өнім шықты. Fp-131-де ДОФА қалдықтарының болуы NBT түсті реакциясында көрсетілді. Fp-131 қосылыстың жабысқыш қасиеті желімделген жылжыту әдісімен өлшенді. Адгерент-пластиналарға жылжыту жүктемелерін салып, Fp-131 көмегімен жабыстырылды. Табиғи MFP салыстырғанда жабысу беріктігі 1,1 МПа болды.

Негізгісөздер: жабысқақ ақуыз, мидии, тирозиназы, ДОФА, адгезиялық беріктілік, биоүйлесімді желім.