

## **GFP (ЖАСЫЛ ФЛУОРЕСЦЕНТТІ АҚУЫЗДАР) МОЛЕКУЛАЛАРЫ ЖАЛҒАНҒАН РЕКОМБИНАНТТЫ АҚУЫЗДАРДАН НАНОБӨЛШЕКТЕР АЛУ**

**Көлбай Т.С., Укбаева Т.Д.**

togzhana.miyassarova@mail.ru, toma.ukbayeva@mail.ru

Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан

**Аннотация:** Онкологиялық аурулар – дамыған елдердің денсаулық қорғау органдарының негізгі мәселесіне айналуы ғажап емес. Қатерлі ісікке қарсы доксорубицин (DOX) антибиотигі онкотерапияда кеңінен қолданылып, қатерлі ісіктің белгілі бір түрімен ауыратын (мысалы, сүт безінің қатерлі ісігі) пациенттері емінің алдыңғы линияларында орын алатын препарат болып табылады. DOX-тың негізгі кемшіліктері – ісіктерде жиналу қабілетіне және жоғары жүйелік улылық, әсіресе, кардиоулылық қасиетіне ие. Бос күйінде DOX эпителиальді барьер арқылы өте алмайды, сондықтан оны тікелей нысанды ауру ұлпаларға жеткізу мәселесі өзекті болып отыр. Қазіргі таңда DOX-ты бағытты жеткізудің жаңа технологиясы жасалуда. DOX рекомбинантты ақуыздан алынған нанобөлшектер (вирустәрізді бөлшектер) құрамына қосылса қабілетті. Осы мақалада DOX жалғанған нанобөлшектерді экспериментальді ағзаларда бақылау үшін оның құрамына GFP молекулаларын қосу тәжірибесі баяндалады.

**Кілт сөздер:** квантты нүктелер, медицина, наноконтейнерлер, диагностика, доксорубицин, флуоресценттілік, вирус тәрізді бөлшектер, рекомбинантты ақуыздар, жасыл флуоресцентті ақуыздар (GFP).

**Аннотация.** Онкологические заболевания - одна из основных проблем здравоохранения в развитых странах. Противоопухолевый антибиотик доксорубицин (DOX) широко применяется в онкотерапии и является препаратом первой линии для лечения пациентов с определёнными видами опухолей, например, раком молочной железы. Основными недостатками DOX являются низкая способность накапливаться в опухолях и высокая системная токсичность, особенно кардиотоксичность. Свободный DOX не проникает через эпителиальные барьеры, что создаёт дополнительные сложности в химиотерапии опухолей в органах, защищённых тканевыми барьерами, поэтому прямая и направленная доставка DOX в ткани-мишени является одним из наиболее актуальных проблем при лечении раковых заболеваний. В наши дни разрабатывается технология доставки этого лекарственного препарата. DOX имеет способность связываться с наночастицами (вирусоподобными частицами). В данной статье изложен ход эксперимента для получения наночастиц их рекомбинантных белков, связанных с зеленым флуоресцентным белком (GFP).

**Ключевые слова:** Квантовые точки, медицина, наноконтейнеры, диагностика, доксорубин, флуоресценция, вирусоподобные частицы, рекомбинантные белки, зеленые флуоресцентные белки (GFP).

**Abstract.** Cancer is one of the major health problems in developed countries. The antitumor antibiotic doxorubicin (DOX) is widely used to treat patients with various types of tumors, such as breast cancer. The main disadvantages of DOX are the low ability to accumulate in tumors and high systemic toxicity, especially cardiotoxicity. Free DOX does not penetrate epithelial barriers, which creates additional difficulties in chemotherapy of tumors in organs protected by tissue barriers; therefore, direct and targeted delivery of DOX to the target tissue is one of the most pressing problems in the treatment of cancer. The technology for delivering this drug is being developed today. DOX has the ability to bind to nanoparticles (virus-like particles). This article outlines the course of the experiment to produce nanoparticles of their recombinant proteins associated with green fluorescent protein (GFP).

**Key words:** Quantum dots, medicine, nanocontainers, diagnostics, doxorubicin, fluorescence, virus-like particles, recombinant proteins, green fluorescent proteins (GFP).

**Кіріспе.** Жұмыстың атқарылуы үшін флуоресцентті белгіленген нанобөлшектер болуы керек. Және ол нанобөлшектер биосейкестік қасиетіне ие және алдағы уақытта биологиялық тосқауылдар арқылы жеткізуші потенциалына ие болып табылуы қажет. Мұндай нанобөлшектер болашақта сыртқы бетіне бағытталған транспорттың пептидтерін немесе жасушалық-енуші пептидтерді жалғау арқылы модификациялануға ұшырауы мүмкін. Ал ол өз кезегінде бағытталған жеткізу жүйесін қалыптастыруға мүмкіндік туғызады.

VLP пішініндегі флуоресцентті белгіленген нанобөлшектер генетикалық инженерия әдістерімен оңай алынады. VLP – табиғи жолмен VLP түзуге қабілетті рекомбинантты ақуыздың суббірліктерінен өздігінен құрастырылу жолымен алынады [1].

Вирустардың көптеген құрылымдық ақуыздары, және негізінен вирустық капсидтің түзілуіне қатысатын ақуыздар, *in vitro* немесе продуцирленуші *in vivo* жағдайында ерітіндіде белгілі бір концентрацияға жеткізілсе, жүйелі түрде бөлшектер шығаруға қабілетті [2]. Ең жақсы зерттелген VLP түзуші капсидті ақуыздардың бірі – В гепатитінің коралық антигені (HBcAg).

**Зерттеу нәтижелері.** HBcAg үшін қосылу ақуызы VLP түзуге қабілетті қасетін жоғалпайтындай етіп, HBcAg құрамына табиғаты бөтен (гетерологиялық) аминқышқылдық қатарларды қою (қосылу ақуыздарын жасау үшін) стратегиясы жасап шығарылды [3]. Берілген стратегия «бөлшектелген кора» (SplitCore) атауын иеленді. SplitCore стратегиясын пайдалану арқылы рекомбинантты ақуыздан жасалған VLP-ға енгізілген гетерологиялық қойылулар бөлшектердің сыртқы бөлігінде көрініс табады. Қойылулар өте үлкен көлемде болуы да мүмкін, қойылудың жол берілетін көлемі классикалық флуоресцентті маркер - жасыл флуоресцентті ақуыздың (GFP) да аминқышқылдық қатарынан көп болуы мүмкін. Жоғарыда аталған технология бойынша алынған бөлшектер өте көп флуоресцентті маркерлерге ие: T3 бөлшектері өз сыртқы бетінде GFP-дің 180 молекуласына ие, ал T4 бөлшектері өз сыртқы бетінде GFP-дің 240 молекуласына ие болып табылады. Флуоресцентті белгілердің осындай жоғары тығыздығы мұндай бөлшектерді биотаралулардың өмірлік визуализациясы жүйелерімен бірге пайдалануды жеңілдетеді, себебі анықтаудың сезімталдығын арттырады [4].

HBcAg суббірлігінің құрамына GFP қатарын қою үшін SplitCore стратегиясын пайдаланатын рекомбинантты ақуыз генінің үлгісі арнайы жасалынды. Мақсатты рекомбинантты қосылу ақуызы SplitCore-GFP деп белгіленген.

SplitCore-GFP гені бицистронды болып табылады, яғни бір мРНҚ-да екі ашық оқу рамкасы болады (ORF). Бицистронды үлгінің болғаны тиімді, себебі бір мРНҚ-дан екі полипептид синтезделеді (N-part және C-part, сурет 7), екеуі де HbcAg молекуласының әр түрлі бөліктеріне ие [5].

SplitCore-GFP генін құрастыру үшін лабораториялық жиынтықта бар HBcAg гені және eGFP гені (GFP-дің мутантты нұсқасы, F64L және S65T мутацияларына ие, жетілу жылдамдығы арттырылған) пайдаланылды. SplitCore-GFP генінің құрастырылуы конструктивті ПТР көмегімен жүзеге асырылды. Құрылымдары 1 кестеде көрсетілген праймерлер пайдаланылды [6].

Кесте 1 - SplitCore-GFP генін синтездеу барысында пайдаланылған праймерлер

| Праймер  | Реттілігі (5'→3')                        | Ұзындығы, нт |
|----------|------------------------------------------|--------------|
| HBc_S1   | TCATCACCATCACTCAGGTGGTATGGATATTGACCCTTAC | 40           |
| HBc_Nco  | CCACCCATGGGGCATCATCATCACCATCACTCAGG      | 35           |
| HBc_AS1  | CACTTTCTTCCCCGCCGCCTCCGTCCTCGAGATTTACCCC | 40           |
| HBc_Kpn  | CTCACGGTACCGCCGCCACCACTTTCTTCCCCGCCGC    | 37           |
| GFP_Kpn  | CGGCGGTACCGTGAGCAAGGGCGAGGAG             | 28           |
| GFP_BsrG | TCTACTTGACAGCTCGTCCAT                    | 22           |
| HBc_S2   | AGTAGAAGGAGATATACATATGTCTAGAGATCTGGTGGTG | 40           |
| HBc_BsrG | GAGCTGTACAAGTAGAAGGAGATATACA             | 28           |
| HBc_Hind | CCACAAGCTTTTAGCACTGGGATTCACGCGA          | 31           |

*E. coli* BL21(DE3) штамы изопропил-бета-D-тиогаляктопиринозида (IPTG) химиялық индукторы қатысуымен T7 фагының РНҚ-полимеразасын синтездейді. T7 РНҚ-полимеразасының қатысуымен pSplitCore-GFP плазмидасынан мақсатты геннің мРНҚ-сы синтезделеді де, қос оқу рамкасының трансляциясы арқылы екі полипептидтің түзілуі жүзеге асады: N-part және C-part.

N-part/C-part кешендері 180 немесе 240 кешен көлемінде штамм-продуцент жасушасында VLP түзуге қабілетті (Т3 және Т4, сәйкесінше). Мұндай VLP құрамындағы GFP молекулалары VLP-ның сыртқы бетіне (ерітіндіге айналдырылған) қаратылған [7].

BL21(DE3) штамының жасушалары pSplitCore-GFP плазмидасымен трансформацияланды, соның нәтижесінде BL21(DE3)/pSplitCore-GFP штамм-продуценті алынды. Препаративті өндіру үшін штамм-продуцентпен түнгі культура отырғызылды (5 мл көлемде), келесі күні ампициллині бар (150 мкг/мл) 1 л LB ортасына көшірілді.

Культура оптикалық тығыздығы OD<sub>600</sub>=0,8 болғанша өсірілді және рекомбинантты ақуыз экспрессиясы IPTG 1 mM-ге дейін қосу арқылы индуцирленді. Индукторы бар культура түні бойы өсірілді. Бактериялар биомассасын центрифугада тұндырып, бактериялды жасушаларды кешенді әдіспен лизирлендіреді: алдымен лизоциммен өңделеді (0,1 мг/мл, 1 ч), ары қарай ультрадыбыспен қысқаша өңделіске ұшырайды.

Лизис шарттары тәжірибелі түрде таңдалып алынды: лизис режимі бұзылған клеткалардан VLP шығуының максималды мөлшеріне қол жеткізу үшін маңызды, және де аса жоғары соникірлеу нәтижесінде VLP-нің өздерін зақымдамау үшін де маңызды. Жасушалардың лизаты төменжылдамдықтағы центрифугалаумен ашық реңделуге ұшырады (6000 айн/мин, 20 мин), супернатант жиналып, аммоний сульфатымен VLP-ны тұнбаландыру

үшін пайдаланылды. Тұнбаландыру үшін супернатантқа соңғы концентрациясы 40% (салмақ/көлем) болғанша аммоний сульфаты қосылды, ерітінді 2 сағат мұзда ұсталып, ақуыздарды центрифугалау арқылы тұнбаландырды (6000 айн/мин, 20 мин).

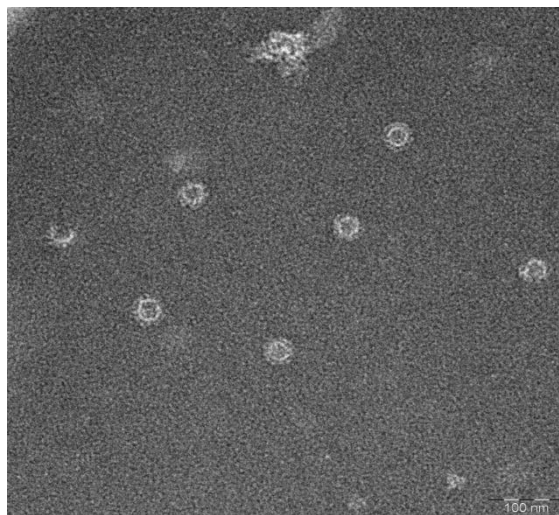
Бөліп алудың бұл кезеңі (градиентте тазалаудың алдындағы VLP тұнбаландырылуы) VLP перпараттарындағы бактериялық ДНҚ қоспаларынан арылуға көмектесіп, перпараттың көлемін кішірейтуге мүмкіндік туғызады. Алынған тұнба 1 мл NH буферінде (градиентте тазалауға арналған азтұзды буфер) ресуспензияланады, қысқа соникирлеу жолымен (1 пульс, 30 сек) қожайын E.coli ақуыздарымен VLP агрегаттары бұзылып, жойылады. Шығарып тастау лимиті 14 кДа болатын диализді мембранадан жасалған диализді қапшыққа суспензияны көшіріп, 2 л NH буферіне қарсы диализ 12 сағат бойы жүргізілді. Диализ барысында тұнба азтұзды буферлерге қиын еритін үлпектер түрінде болады, бұл үлпектер негізінен E.coli-дің жасушалық қабырғасының компоненттері (липополисахаридтер, бактериялды эндотоксин) болып табылады. Диализді қапшықтан шығарылған ерітінді центрифугаландыру арқылы ашық реңдендіріледі (6000 айн/мин, 20 мин).

Супернатантты сахароза ерітіндісінің градиентінің (10%-60%) үстінен қабаттайды. Сынама ультрацентрифугалауға ұшырады (ротор SW41, 35000 айн/мин, 10 сағат, температура +8°C). Флуоресцентті белгіленген VLP-ды градиенттегі ультрацентрифугалау арқылы тазалау ең тиімді әдіс болып табылады [8].

Жоғарыда айтылған тазалаудан кейінгі GFP-белгіленген VLP өнімі 2,4 мг (1 л индуцирленген культурадан) құрады.

Электронды микроскопия нәтижелері препаратта SplitCore-GFP рекомбинанты ақуызынан сфералық нанобөлшектердің күтілетін диаметр бойынша (~35 нм) түзілгендігін дәлелдейді. Аталған нанобөлшектердің ерешелігі – бөлшектің контуры айналасындағы «ореолдың» болуы, болжауымызша, бұл GFP молекуласының бөлшектердің сыртқы бетімен ковалентті байланысқан қабаты болып табылады (1 сурет).

**Қорытынды.** Орындалған жұмыста DOX-ты бағытты жеткізудің жаңа технологиясы жасалып шығарылды. DOX-ты нанобөлшектер (вирустәрізді бөлшектер) құрамына қосып, генетикалық инженерия әдістерінің көмегімен дәрілік препаратты тасымалдаушылар – вирустәрізді бөлшектерді тасымалдаушы транспорт ретінде пайдаланып, емдік іс-шаралардың тиімділігін арттыру негізгі мақсат етіп қойылды. VLP түзетін рекомбинантты ақуыз нанобөлшектерді (мүшелерде жинақталатын) инвазивті емес визуализация жүйесінің көмегімен анықтауға болатындай етіп модификацияланды. Соның нәтижесінде әр түрлі ұлпалық барьерлерден өте алуға қабілетті нанобөлшектер жасалып, оларды биотаралулардың инвазивті емес жүйесі (IVIS Spectrum) арқылы бақылап, айқындау мүмкін болды.



31500X Үлкейту. Фотосуреттің төменгі оң бұрышындағы масштабты шкала 100 нм.  
Сурет 15. Градиентте тазаланған рекомбинантты ақуыздан алынған нанобөлшектердің трансмиссионды электронды микроскопиясының микрофотосуреті.

### Әдебиеттер тізімі

1. Абаева Л.Ф., Шумский В.И., Петрицкая Е.Н., Рогаткин Д.А., Любченко П.Н. 2010. Наночастицы и нанотехнологии в медицине сегодня и завтра. Альманах клинической медицины № 22, Б. 10-16.
2. Moritz Mickler. 2007. Revealing the bifurcation in the unfolding pathways of GFP by using singlemolecule experiments and simulations. Б. 101.
3. Алферов Ж.И., Копьев П.С., Сулис Р.А., Асеев А.Л., Гапонов С.В. Панов В.И., Полторацкий Э.А., Сибельдин Н.Н. 2005. Наноматериалы и нанотехнологии. Нано- и микросистемная техника. От исследований к разработке: Сб. статей под ред. д.т.н., проф. П.П. Мальцева. М.Б. 19.
4. D. Paredes, C. Ortiz, R. Torres. 2014. Int. J. Nanomedicine, 3 (9): 1717-1729.
5. Зубкова Г.И. 2011. Нанотехнологии в медицине. Вестник Казанского технологического университета. 2 (2), Б. 191-192.
6. Масычева В.И., Даниленко Е.Д., Белкина А.О. и др. 2008. Наноматериалы. Регуляторные вопросы. Ремедиум. 2 (9), б. 12-16.
7. Gillies E. R, Frechet J. M. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery // Drug Discovery Today. – 2005. – Vol. 10, №1. – Б. 35–37.
8. Baltabekova A. Zh., Shagyrova Zh. S., Kamzina A. S., Voykov M., Zhiyenbay Y., Ramanculov E. M., Shustov A. V. SplitCore Technology Allows Efficient Production of Virus-Like Particles Presenting a Receptor-Contacting Epitope of Human IgE // Mol Biotechnol. - 2015. - V.57. - N.8. - Б.746-755.

### References

1. Abaeva L.F., Shumskiy V.I., Petritskaya E.N., Rogatkin D.A., Lyubchenko P.N. 2010. Nanochastitsy i nanotekhnologii v meditsine segodnya i zvatra [Nanoparticles and nanotechnologies in medicine today and tomorrow]. Al'manakh klinicheskoy meditsiny № 22, P. 10-16. (in Russian)
2. Moritz Mickler. 2007. Revealing the bifurcation in the unfolding pathways of GFP by using singlemolecule experiments and simulations. Б. 101.
3. Alferov Zh.I., Kop'ev P.S., Suris R.A., Aseev A.L., Gaponov S.V. Panov V.I., Poltorackij Je.A., Sibel'din N.N. 2005. Nanomaterialy i nanotekhnologii. Nano- i mikrosistemnaja tehnika. Ot issledovaniy k razrabotke: Sb. statej [Nanomaterials and nanotechnology. Nano- and Microsystems. From research to development: Coll. articles]. Pod red. d.t.n., prof. P.P. Mal'ceva. M. P. 19. (in Russian)
4. D. Paredes, C. Ortiz, R. Torres. 2014. Int. J. Nanomedicine, 3 (9), P. 1717-1729.
5. Zubkova G.I. 2011. Nanotekhnologii v meditsine [Nanotechnology in medicine]. Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta. 2 (2), P. 191-192. (in Russian)
6. Masycheva V.I., Danilenko E.D., Belkina A.O. i dr. 2008. Nanomaterialy. Regulyatornye voprosy [Nanomaterials. Regulatory matters]. Remedium. 2 (9), P. 12-16. (in Russian)
7. Gillies E. R, Frechet J. M. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery // Drug Discovery Today. – 2005. – Vol. 10, №1. – P. 35–37.
8. Baltabekova A. Zh., Shagyrova Zh. S., Kamzina A. S., Voykov M., Zhiyenbay Y., Ramanculov E. M., Shustov A. V. SplitCore Technology Allows Efficient Production of Virus-Like Particles Presenting a Receptor-Contacting Epitope of Human IgE // Mol Biotechnol. - 2015. - V.57. - N.8. - P.746-755.