



УДК 577.112.083

ПОЛУЧЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ЧАСТИ РЕЦЕПТОРА ErbB2 ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

© 2020 г. В. С. Рыбченко^{*,#}, Д. С. Балабашин^{**}, А. А. Панина^{**}, О. Н. Солопова^{***, ****},
С. А. Якимов^{**}, Т. К. Алиев^{****}, Д. А. Долгих^{*, **}, М. П. Кирпичников^{*, **}

^{*}Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Россия, 119192, Москва, Ленинские Горы, 1/12

^{**}ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

^{***}Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения,
Россия, 117638, Москва, Симферопольский бульвар, 8

^{****}Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет
Россия, 119234, Москва, Ленинские Горы, 1/3

^{*****}ФБГУ “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина”, Россия, 115478, Москва, Каширское ш., 23

Поступила в редакцию 02.12.2019 г.

После доработки 09.12.2019 г.

Принята к публикации 10.12.2019 г.

Методом экспрессии в эукариотических клетках СНО получена внеклеточная часть рецептора ErbB2 (extracellular domain ErbB2), являющегося одним из онкологических маркеров, а также мишенью для терапевтических антител. Внеклеточная часть рецептора была выделена из культуральной жидкости с помощью металл-аффинной хроматографии и охарактеризована биохимическими и иммунохимическими методами. Было показано, что выделенный рецептор состоит из мономерной, димерной и тримерной форм. Олигомерные формы разделяли методом гель-фильтрации и характеризовали по способности связывания с терапевтическим препаратом “герцептин”, являющимся одним из основных препаратов терапии опухолей молочной железы. Полученный рецептор может быть использован *in vitro* для иммунохимических экспериментов.

Ключевые слова: ErbB2, СНО, трастузумаб, SK-OV-3

DOI: 10.31857/S0132342320030306

ВВЕДЕНИЕ

Рецептор ErbB2 является одним из 4 белков, входящих в семейство рецепторов эпидермального фактора роста. Рецепторы этого семейства играют важную роль в клеточной миграции, пролиферации и дифференцировке. Повышенный уровень экспрессии ErbB2, а также ErbB1 (EGFR) обычно связан со злокачественным перерождением клеток и канцерогенезом. Увеличение экспрессии ErbB2 наблюдают для клеток раковых опухолей молочной железы [1], легких [2, 3], шейки матки, почек, прямой кишки, уротелия [4] и других органов и тканей. У 32% пациентов с ErbB2-позитивными опухолями наблюдаются он-

когенные мутации, расположенные преимущественно в I–II доменах внеклеточной части рецептора [11] и тирозинкиназном домене [10]. Добавление к ErbB2-позитивным опухолевым клеткам антисмысловых малых интерферирующих РНК к мРНК гена ErbB2 приводит к уменьшению скорости их пролиферации, увеличению количества клеток, подверженных апоптозу, что, в свою очередь, ведет к уменьшению роста опухоли [12]. В связи с изложенными фактами, ErbB2 является перспективной мишенью для исследования и терапии ErbB2-позитивных опухолей. На данный момент существует несколько препаратов, нацеленных на этот рецептор. Одним из первых препаратов, одобренных FDA, является моноклональное антитело “Трастузумаб” (торговая марка “Герцептин”), которое взаимодействует с IV внеклеточным доменом ErbB2, препятствует димеризации рецептора [13] и функционированию его в качестве корецептора. Дополнительным механизмом действия антитела Трастузумаб

Сокращения: ScFv-HSA – single-chain variable fragment – human serum albumin; ecdErbB2 – внеклеточная часть рецептора ErbB2 (extracellular domain ErbB2); ФБС(Т) – фосфатно-солевой буфер (с добавлением Tween-20); ТБС(Т) – трис-солевой буфер (с добавлением Tween-20).

[#] Автор для связи: (тел: +7 (977) 272-87-63; эл. почта: vladislavrusia@yandex.ru).

является антителозависимая клеточная цитотоксичность [14]. Известен также другой препарат – Пертузумаб, являющийся моноклональным антителом, которое взаимодействует со II доменом рецептора ErbB2. Поскольку эпитопы для этих двух антител являются различными, то совместное использование препаратов этих двух антител оказывает более существенный эффект ингибирования роста опухоли, нежели при монотерапии [15]. Помимо упомянутых препаратов антител, существует несколько других полноразмерных антител и их фрагментов, связывающихся с рецептором ErbB2 и оказывающих противоопухолевое действие. Например, Маргетуксимаб является химерным антителом, связывающимся с тем же эпитопом, что и Трастузумаб, но имеющим более высокое сродство к Fc-рецепторам клеток иммунной системы, в результате чего противоопухолевый эффект, обусловленный антителозависимой клеточной цитотоксичностью, оказывается выше. На данный момент осуществляется активный поиск и разработка новых антител, нацеленных на рецептор ErbB2, с увеличенными цитотоксичностью и противоопухолевым действием по сравнению с существующими препаратами. Например, на 2-ой стадии клинических испытаний находится биспецифическое антитело MCLA-128. Данное антитело связывается с двумя рецепторами опухолевых клеток, ErbB2 и ErbB3 [22]. Существует также ряд препаратов, представленных фрагментами антител. На основе однодоменных антител лампы было получено химерное антитело C3 [20], содержащее вариабельный домен тяжелой цепи лампы и Fc-фрагмент человеческого антитела. Такой рекомбинантный белок лучше проникает в твердые опухоли, чем полноразмерные антитела, и обладает достаточным для терапевтического применения периодом полувыведения из организма. Для увеличения периода циркуляции в крови и доставки к опухолевым клеткам цитотоксических агентов, присоединенных к антителам химическим путем, могут быть использованы антитела формата ScFv-HSA (одноцепочечный вариабельный фрагмент – человеческий сывороточный альбумин) [21]. Еще одной группой препаратов, воздействующих на рецептор ErbB2, являются ингибиторы тирозинкиназы, которые препятствуют перекрестному транс-фосфорилированию и передаче сигнала внутрь клетки по PI3K и MAPK-путям [16], что также приводит к замедлению клеточной пролиферации и увеличению количества клеток, подверженных гибели через апоптоз.

Молекула ErbB2 состоит из 1225 аминокислот и обладает молекулярной массой в 134.9 кДа. Структурно рецептор ErbB2 разделен на три части: внеклеточную, внутриклеточную и трансмембранную. Трансмембранная часть представлена короткой α -спиралью, образованной аминокис-

лотами 653–675 [5]. Внутриклеточная часть (аминокислоты 676–1255) образует тирозинкиназный домен, играющий ключевую роль в передаче сигнала с рецептора внутрь клетки. Внеклеточная часть рецептора ErbB2 (ecdErbB2, аминокислоты 24–652) состоит из 4 доменов с большим числом (25) дисульфидных связей и содержит несколько участков гликозилирования [6]. У всех рецепторов семейства Erb, за исключением ErbB2, домены I и III образуют участок, связывающийся с лигандом. В отличие от остальных рецепторов семейства, лиганд для ErbB2 до сих пор неизвестен [7]. Согласно проведенным структурным исследованиям I и III домены у рецептора ErbB2 находятся в закрытой конформации, в которую остальные рецепторы семейства переходят, связавшись с лигандом. Такой переход из открытой в закрытую конформацию приводит к тому, что плотные контакты II и IV доменов нарушаются, высвобождая на поверхности IV домена участки, являющиеся ключевыми в димеризации рецептора [13]. Хотя ErbB2 не способен связываться с лигандами, известными для остальных рецепторов семейства ErbB, он может функционировать в качестве корецептора, при этом увеличивая сродство к лигандам, что особенно важно для рецептора ErbB3, у которого отсутствует тирозинкиназная активность [8, 9].

В связи со сложной структурой рецептора ErbB2 его продукция с целью использования в иммунохимических экспериментах или для иммунизации животных является непростой задачей. Существует несколько подходов получения данного белка. Одним из них является использование бактериальных бесклеточных систем экспрессии. Такой способ позволяет получить очищенный препарат белка, однако продуктивность бесклеточной системы является низкой, около 2 мкг/мл реакционной смеси [18]. Другой подход описан в статье Франклина и соавторов [19], при котором сигнальные последовательности рецептора заменялись на аналогичные последовательности гликопротеина D вируса герпеса. Очистка рецептора из клеточных лизатов осуществлялась с помощью антител к гликопротеину D. Часть рецептора, состоящая из внеклеточных доменов, была получена после присоединения соматотропина для улучшения секреции рекомбинантного рецептора [13]. Такой подход потребовал отщепления соматотропина и дополнительного этапа очистки с помощью гель-фильтрации.

Вышеизложенные факты подтверждают, что получение рецептора ErbB2 является трудоемким процессом, а изучение его свойств является важной задачей для создания и разработки диагностических и терапевтических средств против ErbB2-позитивных опухолей.

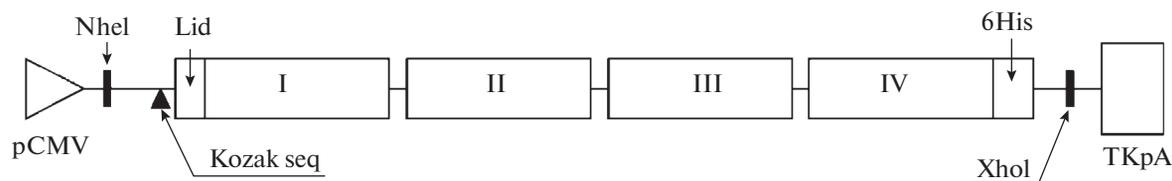


Рис. 1. Схематическое изображение экспрессионной кассеты ecdErbB2 в составе плазмиды pcDNA3.4/ecdErbB2. CMV – промотор цитомегаловируса, ТКрА – терминатор тимидинкиназы, содержащий сигнал полиаденилирования, 6His – гексагистидиновая последовательность, Lid – лидерный пептид рецептора ErbB2, Kozak seq – последовательность Козак, NheI, XhoI – участки узнавания эндонуклеаз рестрикции.

Целью нашей работы являлась разработка метода получения рекомбинантного белка внеклеточной части рецептора ErbB2 (ecdErbB2) в больших количествах, по сравнению с известными методами, без потери качества, необходимого для тестирования терапевтических и диагностических антител.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантного белка ecdErbB2

В представленной работе для получения гена ErbB2 использовали ErbB2-позитивные клетки цистаденокарциномы яичников человека линии SK-OV-3, из которых выделяли тотальную мРНК и осуществляли обратную транскрипцию для получения кДНК. На матрице кДНК с помощью ПЦР амплифицировали фрагмент нуклеотидной последовательности, кодирующий I–IV домены ecdErbB2. Олигонуклеотиды, использованные для амплификации фрагмента, были подобраны таким образом, что фланкировали начало 2-го и конец 15-го экзона гена ErbB2 (NCBI, Genome Data Viewer: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/>). Праймеры были проверены с помощью программы NCBI Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) на отсутствие неспецифических участков отжига в геноме человека и китайского хомячка, клетки которого (CHO) далее нами использовались для получения рекомбинантного белка ecdErbB2. Во фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность ecdErbB2, мы вводили нуклеотидные последовательности собственного лидерного пептида (по N-концу рецептора для обеспечения секреции белка в культуральную жидкость) и шести гистидинов (по C-концу белка, после аминокислот PINCTHSCV, для очистки этого белка с помощью металл-аффинной хроматографии). Добавление лидерного пептида и гексагистидиновой последовательности осуществляли в ходе двухстадийной полимеразной цепной реакции без предварительного получения фрагментов, кодирующих лидерный пептид и гексагистидиновой последовательности, с помощью 5 праймеров (ERBB2LidF1, ERBB2LidF2,

ERBB2LidR1, ERBB2HisF1, ERBB2HisR1). Полученная конструкция была снабжена участками узнавания эндонуклеаз рестрикции NheI и XhoI и помещена в экспрессионный вектор pcDNA3.4 (Invitrogen, США) под контроль сильного промотора CMV и терминатора тимидинкиназы, содержащего сигнал полиаденилирования (ТКрА) (рис. 1). В результате была получена экспрессионная плаزمида pcDNA3.4/ecdErbB2.

Полученную таким образом нуклеотидную последовательность секвенировали по методу Сэнгера, сравнили с последовательностью транскрипта гена внеклеточной части ErbB2, находящуюся в базе данных NCBI (accession number NM_004448.3, NCBI Gene Bank), обнаружили ее полное совпадение этим с геном в составе конструкции pcDNA3.4/ecdErbB2. Для продукции белка ecdErbB2 была осуществлена транзientная трансфекция синхронизированной культуры клеток CHO. Клетки культивировали в течении 14 суток, после чего осаждали центрифугированием, добавляли к супернатанту азид натрия (1 мг/мл), PMSF (0.5 мг/мл) и выделяли белок ecdErbB2 на металл-аффинном носителе, уравновешенном ионами Co^{2+} . Концентрацию белка определяли по оптическому поглощению при 280 нм. Определенный уровень продукции составил 10–30 мг/л культуры.

Биохимическая и иммунохимическая характеристика рекомбинантного белка ecdErbB2. Состав белкового препарата, полученного на металл-аффинном носителе, оценивали методом гель-фильтрации на хроматографической колонке с носителем Superdex 200 GL. В ходе разделения препарата наблюдали, что он состоит из трех пиков, каждый из которых собирали в отдельную фракцию (рис. 2а) Анализ препарата белка методом ДСН-ПААГ электрофореза в невозстанавливающих условиях также показал наличие трех белков с молекулярными массами 90, 180 и, предположительно 270 кДа. При добавлении в 4х буфера для нанесения при подготовке проб для белкового электрофореза был использован 5% β-меркаптоэтанол. После этого вместо трех полос наблюдали одну полосу с молекулярной массой 90 кДа (рис. 2б), превышающей расчетную молекулярную массу рекомбинантного белка ecdErbB2 (72 кДа).

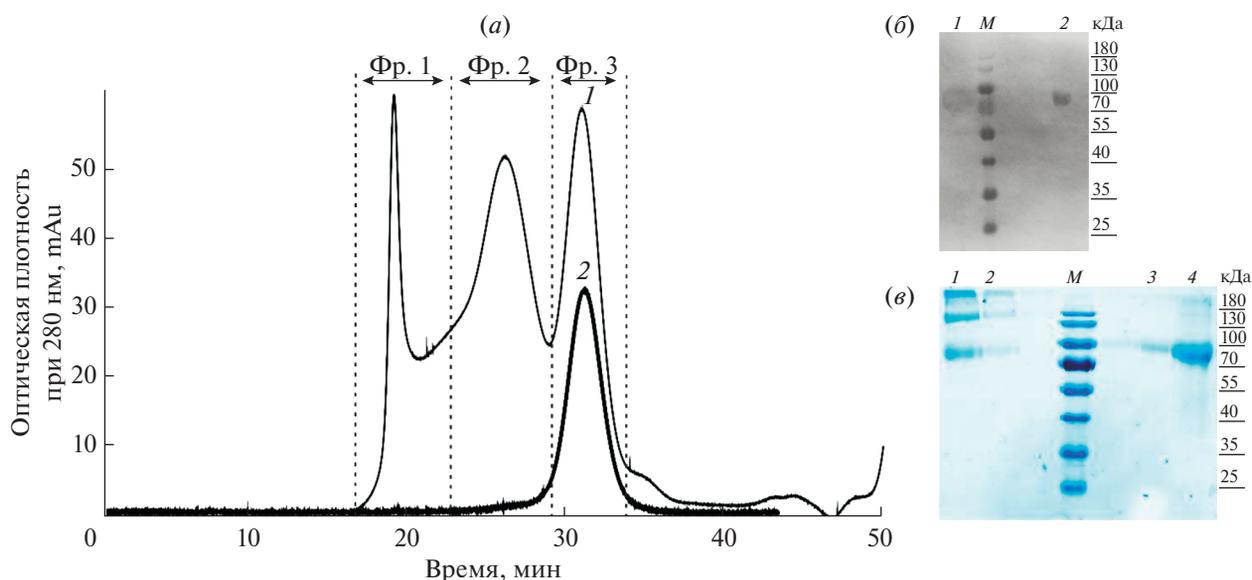


Рис. 2. Оценка чистоты белкового препарата ecdErbB2. (а) Хроматограмма гель-фильтрации: линия 1 – разделение препарата ecdErbB2 после металл-аффинной хроматографии, линия 2 – мономерная форма рекомбинантного белка ecdErbB2 (фракция пика 3); (б) иммуноблот 4 мкг белкового препарата ecdErbB2 с анти-гексагистидиновым конъюгатом, 1 – в невосстанавливающих условиях, 2 – в восстанавливающих условиях, М – маркеры молекулярных масс; (в) электрофореграмма ecdErbB2 в 10% ДСН-ПААГ: 1, 2 – 4 и 1 мкг ecdErbB2 в невосстанавливающих условиях, 3, 4 – 4 и 1 мкг ecdErbB2 в восстанавливающих условиях, М – маркеры молекулярных масс.

Отличия в расчетной и экспериментально определенной молекулярных массах полноразмерного рецептора ErbB2, отмеченные также в других работах [23, 24], могут быть связаны с гликозилированием внеклеточной части рецептора. Поскольку в нашей работе при добавлении β-меркаптоэтанола белки с мол. массами 180 и 270 кДа диссоциируют до белка с мол. массой 90 кДа, можно предположить, что данные белки являются димерной и тримерной формами ecdErbB2. Так как ecdErbB2 содержит большое количество дисульфидных связей, то наличие выявленных олигомерных форм, предположительно, вызвано их некорректным образованием в процессе фолдинга. Для доказательства подлинности белка ecdErbB2 мы провели иммуноблоттинг белка с антителами против гексагистидиновой последовательности, находящейся в составе рекомбинантной молекулы ecdErbB2. После электрофоретического разделения препарата белка ecdErbB2, полученного на металл-аффинном носителе, в 10% полиакриламидном геле белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану путем электрофоретического переноса (электроблота). Мембрану обрабатывали раствором БСА и инкубировали с раствором антител против гексагистидиновой последовательности, конъюгированных с пероксидазой хрена. Наличие окрашенной полосы с молекулярной массой 90 кДа как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях подтверждает подлинность мономерной формы ecdErbB2 (рис. 2б).

Иммунохимическая характеристика рекомбинантного белка ecdErbB2

Полученные с помощью гель-фильтрации фракции белка ecdErbB2 анализировали на наличие способности связываться с препаратом “Герцептин”, представленного антителом Трастузумаб, методом непрямого ИФА. Было показано, что все три фракции (рис. 2а) способны связываться с этим антителом (рис. 3), что подтверждает наше предположение о том, что продукты с молекулярными массами 180 и 270 кДа являются димерной и тримерной формами ecdErbB2. Необходимо отметить, что олигомерные формы обладают более высокими значениями эффективной концентрации EC_{50} по сравнению с мономерной фракцией. Значения EC_{50} составили 1.23, 1.13 и 0.66 мкг/мл для тримерной, димерной и мономерной форм, соответственно. Можно предположить, что более низкая активность олигомерных форм рецептора по сравнению с мономерной формой вызвана тем, что часть эпитопов оказывается недоступной для связывания с антителом.

Принимая во внимание, что все 3 формы белка ecdErbB2, охарактеризованные гель-фильтрацией, присутствующие в препарате после выделения металл-аффинной хроматографией, показывают высокую активность связывания с антителом Трастузумаб, можно сделать вывод о том, что предложенный нами метод позволяет получать быстро, в одну стадию очистки, достаточные количества (10–30 мг/л культуры) активного ecdErbB2 для имму-

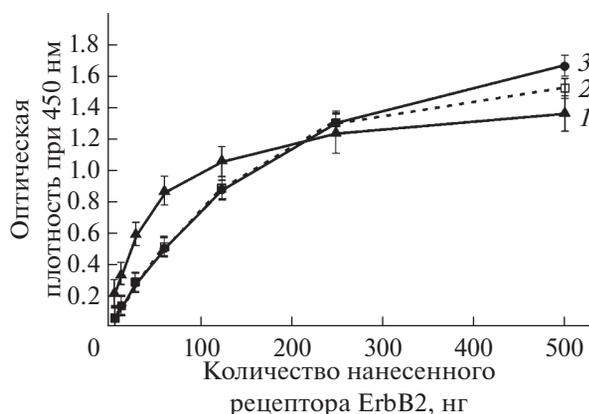


Рис. 3. Определение связывания белка еcdErbB2 с антителом трастузумаб, полученного во фракциях после разделения гель-фильтрацией (рис. 2а): 1 соответствует фракции 1, 2 – фракции 2, 3 – фракции 3.

нохимических экспериментов. При этом дополнительный этап очистки методом гель-фильтрации позволяет получить мономерную форму еcdErbB2, обладающую более низким значением EC_{50} по сравнению с олигомерными формами.

ВЫВОДЫ

Для проведения иммунохимических экспериментов был получен рекомбинантный белок еcdErbB2 с уровнем продукции 10–30 мг/л, что значительно превышает уровень продукции описанный ранее [13, 18, 19]. Описанный в данной статье способ получения еcdErbB2 является более простым и удобным для получения данного рекомбинантного белка по сравнению с уже известными методами получения [13, 18, 19]. В работе была сконструирована экспрессионная плаزمида рсDNA3.4/ecdErbB2 для продукции еcdErbB2 в культуре эукариотических клеток CHO. В состав экспрессионной кассеты вводили нуклеотидные последовательности собственного лидерного пептида ErbB2 для обеспечения секреции в культуральную жидкость и гексагистидиновой последовательности для очистки рекомбинантного еcdErbB2 с помощью металл-аффинной хроматографии. Рекомбинантный белок еcdErbB2 получали путем транзientной трансфекции культуры клеток яичника китайского хомячка (CHO). Выделенный на металл-аффинном носителе препарат белка еcdErbB2 состоял из мономерной, димерной и тримерной форм, каждая из которых связывала антитело трастузумаб. Полученный рекомбинантный белок еcdErbB2 может быть использован для изучения свойств широкого спектра антител и их производных, направленных к рецептору ErbB2.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В представленной работе были использованы следующие реактивы и штаммы бактерий: питательная среда OptiCHO (Invitrogen, США), раствор пенициллин-стрептамицин-фунгизон (Anti-anti) (Invitrogen, США), реагент TRIzol (GibcoBRL, Шотландия), реагент для трансфекции lipofectamine 2000 (Invitrogen, США), однокомпонентный субстрат тетраметилбензидин (TMB) (НПО “Биотест Системы”, Россия), Tween-20, эндонуклеазы рестрикции (Thermo Scientific или Fermentas, Литва, США), ДНК-полимераза Tersus (Евроген, Россия), обратная транскриптаза M-MuLV (Thermo Scientific, США), вектор рAL-TA (Евроген, Россия), вектор рсDNA3.4 (Thermo Scientific, США), соосадитель нуклеиновых кислот “satellite red” (Евроген, Россия), набор Plasmid Miniprep (Евроген, Россия), ФБС (10 мМ $Na(H_2PO_4)$ – $Na_2(HPO_4)$, 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, pH 7.2, Amresco, США), маркеры белковых масс для электрофореза (Fermentas, Литва), нитроцеллюлозная мембрана (ADVANTEC, Япония), антитело к гексагистидиновой последовательности, конъюгированное с пероксидазой хрена (ВНЦМДЛ, Россия), проявляющий субстрат тетраметилбензидин (ЗАО “НВО Иммунотех”, Россия), T4-ДНК-лигаза (Thermo Scientific, США), DMSO (Sigma), бактоагар, дрожжевой экстракт, триптон (BD, Франция), штамм *E. coli* XL1-Blue (a, b 3 recA1 endA1 gyrA96 thi₁ hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proABlacI-qZΔM15 Tn10 (Tetr)]) (Stratagene, США). Другие химические реактивы были получены из коммерческих источников и использованы без предварительной очистки.

Были использованы приборы: колонка (BioRad, 20 мл, объем носителя 1 мл) Co-NTA Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Швеция); 0.22 мкм PVDF фильтр Millex GV (Millipore, Ирландия); планшеты для ИФА Nunc Maxisorp (Thermo Scientific, США); колонка Superdex 200 GL, объемом 23.5 мл (GE Healthcare); хроматограф Akta Pure 25 (GE Healthcare); система для вертикального электрофореза Bio-Rad Mini-Protean 3 cell (Bio-RAD, США); планшетный спектрофотометр Microplate Reader 680 (BioRad, США).

Получение кДНК из клеток SK-OV-3. Выделение тотальной РНК осуществляли из 10^5 клеток линии SK-OV-3 с помощью реагента TRIzol согласно протоколу производителя. Качество полученной мРНК определяли по соотношению коэффициентов поглощения A_{260}/A_{280} , принимая допустимыми значения 1.95–2, и с помощью метода электрофореза нуклеиновых кислот в 1% агарозном геле. Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью обратной транскриптазы M-MuLV RT (Thermo Scientific, США) с Oligo(dT)₁₈ праймером согласно протоколу произво-

дителя. Полученную кДНК разделяли на аликвоты и хранили при -70°C .

Получение кодирующей последовательности ecdErbB2. Нуклеотидную последовательность, кодирующую I–IV внеклеточные домены рецептора ErbB2, амплифицировали на матрице кДНК, полученной из клеток SK-OV-3. Реакцию ПЦР осуществляли с помощью Tersus-полимеразы с праймерами ERBB2F2 GTGTGCACCGG-CACAGACATGAAG и ERBB2R2 GGAGTGG-GTGCAGTTGATGGGGC. При амплификации использовали следующие параметры реакции: денатурация 92°C , 20 с; отжиг 55°C , 20 с; элонгация 72°C , 2 мин; количество циклов – 35. Продукты реакции разделяли в агарозном геле методом электрофореза нуклеиновых кислот и выделяли фрагмент размером 1827 п. о. с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля “Cleanup Mini”. Выделенный фрагмент лигировали в pAL2-T вектор при 12°C в течение ночи. Лигазной смесью трансформировали приготовленные электрокомпетентные клетки *E. coli* штамма XL-1 blue, высевали клетки на LB-агар с ампицилли-

ном (150 мкг/мл) и культивировали в течение ночи при 37°C . Колонии анализировали с помощью бело-голубой селекции и ПЦР. Отобранные колонии культивировали в течение ночи в 10 мл LB-среды с добавлением ампициллина (150 мкг/мл) в 50 мл пробирках типа Фалькон при скорости агитации 250 об./мин и выделяли плазмидную ДНК с помощью набора Plasmid Miniprep. Нуклеотидную последовательность, кодирующую ecdErbB2, определяли секвенированием по методу Сэнгера.

Получение экспрессионной плазмиды для продукции ecdErbB2. В экспрессионный вектор pcDNA3.4 методом химико-ферментативного синтеза в нуклеотидную последовательность, кодирующую ecdErbB2, вводили последовательность лидерного пептида рецептора ErbB2 и участок узнавания эндонуклеазы рестрикции NheI на 5'-конец, а на 3'-конец вводили нуклеотидную последовательность гексагистидиновой последовательности и участок узнавания эндонуклеазы рестрикции XhoI. Фрагмент, кодирующий ecdErbB2, амплифицировали с праймерами

ERBB2LidF1 AGGGAAGCTAGCGCCACCATGGAGCTGGCGGCCTTGTGCCGCTGGGGG,
 ERBB2LidR1 GCTCGCGGCTCCGGGGGGCAAGAGGGGCGAGGAGGCCCCAGCGGCACAAGG,
 ERBB2LidF2 CCCCAGGAGCCGCGAGCACCAAGTGTGCACCCGGCAGAGACA,
 ERBB2HisF1 CCATCAACTGCACCCACTCCTGTGTGCATCATCACCATCATCACTGAGT,
 ERBB2HisR1 AAGGGACTCGAGTCGCACTCAGTGATGATGGTGATGAT.

Продукты реакции пересаждали этанолом, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции FastDigest NheI и FastDigest XhoI, разделяли в агарозном геле методом электрофореза нуклеиновых кислот, выделяли фрагмент размером 1950 п. о., клонировали его в предварительно дефосфорилированный экспрессионный вектор и получили плазмиду pcDNA3.4/ecdErbB2.

Экспрессия рекомбинантного белка ecdErbB2 в клетках CHO и его очистка. Белок ecdErbB2 получали путем транзientной экспрессии в клетках CHO, культивирование которых проводили в колбах Эрленмейера в 30 мл среды CD DG44 (Invitrogen, США) в термостатируемом CO_2 -инкубаторе при 37°C , 8% CO_2 , при скорости ротации 135 об./мин в течение 14 суток. Трансфекцию клеток CHO осуществляли плазмидой pcDNA3.4/ecdErbB2 (18 мкг плазмидной ДНК на 30 мл культуры) при стартовой клеточной плотности 3×10^5 кл./мл с помощью трансфектанта Lipofectamine 2000.

Среду осветляли путем центрифугирования при 3000 g в течение 30 мин, добавляли 0.1 объема 10-кратного фосфатно-солевого буфера ФБС и 30 мл культуральной жидкости, наносили на колонку с носителем Co-NTA Chelating Sepharose Fast Flow, предварительно уравновешенную 10 мМ ФБС. Колонку промывали 3 мл раствора 50 мМ имидазо-

ла в ФБС, белок ecdErbB2 элюировали фракция-ми объемом 1 мл с помощью 500 мМ имидазола в ФБС и диализовали против ФБС. Выделенный белок рецептора стерилизовали с помощью 0.22 мкм PVDF фильтра Millex GV и хранили при 4°C . Концентрацию белка определяли по поглощению при $\lambda = 280$ нм. Гель-фильтрацию осуществляли на колонке Superdex 200 GL объемом 23.5 мл уравновешенной буфером ТБС (0.1 М Трис-НСl, 0.15 М NaCl, 5% iPrOH, pH 7.5) на хроматографе Akta Pure 25. На колонку наносили 200 мкг белка в 230 мкл буфера ТБС, разделение белков осуществляли при скорости потока 0.4 мл/мин. Детекцию разделения белков проводили по оптическому поглощению при $\lambda = 280$ нм. Получили 53 мкг белка во фракции 1 пика хроматограммы гель-фильтрации, 106 мкг белка во фракции 2 пика и 70 мкг белка во фракции 3 пика. Белок фракции 3 пика в количестве 50 мкг повторно наносили на колонку для доказательства его чистоты.

Аналитические методы. Определение концентрации белка осуществляли по поглощению при 280 нм на наноспектрофотометре Implen P300. Коэффициент молярной экстинкции рассчитывали при помощи сервиса ExPASy ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>). Чистоту препарата белка оценивали электрофорезом белков в денатурирующих условиях в 10% ПААГ по методу

Лэммли [17]. Для подготовки проб к ним добавляли 5× буфер для нанесения (250 мМ Tris-HCl pH 6.8, SDS 5%, 0.05% бромфеноловый синий, 40% глицерин) и инкубировали в течение 5 мин при 95°C. Электрофорез проводили в восстанавливающих и не восстанавливающих условиях. Для разделения компонентов смеси белков использовали систему для вертикального электрофореза Bio-Rad Mini-Protean 3 cell, окрашивание осуществляли красителем Coomassie brilliant blue R250.

Иммуноблоттинг и ИФА. После электрофоретического разделения препарата белка ecdErbB2 разделенные белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану с использованием буфера для переноса (25 мМ Tris, 192 мМ глицин, 20% метанол, pH 8.5). Неспецифическую сорбцию на мембране блокировали 5% раствором БСА при 4°C в течение ночи и промывали три раза буфером ТБСТ (20 мМ Tris, 150 мМ NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.6). После этого мембрану помещали в раствор антитела к гексагистициновой последовательности, конъюгированного с пероксидазой хрена, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее мембрану пять раз промывали раствором ТБСТ и добавляли однокомпонентный преципитирующий субстрат тетраметилбензидин. Мембрану инкубировали в течение 5–10 минут, после чего реакцию останавливали, промывая мембрану дистиллированной водой.

Непрямой ИФА использовали для определения способности полученного белка ecdErbB2 взаимодействовать с препаратом “Герцептин” (антитело Трастузумаб). Все измерения осуществляли трижды. В первую лунку планшета вносили 0.5 мкг рецептора, далее делали двукратные разведения 7 раз. Лунки планшета блокировали 1% раствором БСА в 10 мМ фосфатно-солевом буфере при 37°C в течение часа, после чего добавляли раствор антитела против рецептора ErbB2 (5 мкг/мл). Лунки планшета промывали ФБС с добавлением детергента Tween-20, 0.05%, пять раз и инкубировали с раствором антивидовых поликлональных антител против человеческого иммуноглобулина класса IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, США). После этого лунки промывали 9 раз фосфатно-солевым буфером с добавлением Tween-20, 0.05%, и добавляли проявляющий субстрат тетраметилбензидин. Реакцию останавливали, добавляя 0.5 М фосфорную кислоту, до концентрации 0.25 М. Реакцию связывания определяли по оптическому поглощению при $\lambda = 450$ нм на планшетном спектрофотометре Microplate Reader 680. Для определения величины EC50 строили функцию зависимости оптической плотности (Y) от концентрации оптической плотности (X) в логарифмической системе координат

и использовали уравнение $Y = \frac{A - B}{1 + \frac{X}{EC50}}$, где A

– максимальное значение функции, B – минимальное значение.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнялась при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2019-1385 от 19.06.2019, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60417X0189).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Eccles A. S.* // J. Mam. Gl. Biol. Neopl. 2001. V. 6. P. 393–406.
<https://doi.org/10.1023/A:1014730829872>
2. *Cappuzzo F., Varella-Garcia M., Shigematsu H., Domenichini I., Bartolini S., Ceresoli G.L., Rossi E., Ludovini V., Gregorc V., Toschi L., Franklin W.A., Crino L., Gazdar A.F., Bunn P.A., Jr., Hirsch F.R.* // J. Clin. Onc. 2005. V. 23. P. 5007–5018.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2005.09.111>
3. *Engelman J.A., Cantley L.C.* // Clin. Canc. Res. 2006. V. 12. P. 4372–4376.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0795>
4. The human protein atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000141736-ERBB2/pathology>.
5. *Mineev K.S., Bocharov E.V., Pustovalova Y.E., Bocharova O.V., Chupin V.V., Arseniev A.S.* // J. Mol. Biol. 2010. V. 400. P. 231–243.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.05.016>
6. UniProt database. <https://www.uniprot.org/uniprot/P04626>.
7. *Klapper L.N., Glathe S., Vaisman N., Hynes N.E., Andrews G.C., Sela M., Yarden Y.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 4995–5000.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.4995>
8. *Sierke S.L., Cheng K., Hong-Hee K., Koland J.G.* // Biochem. J. 1997. V. 322. P. 757–763.
<https://doi.org/10.1042/bj3220757>
9. *Fitzpatrick V.D., Pisacane P.I., Vandlen R.L., Sliwkowski M.X.* // FEBS Letters. 1998. V. 431. P. 102–106.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00737-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00737-6)
10. *Hyman D.M., Piha-Paul S.A., Won H., Rodon J., Saura C., Shapiro G.I., Juric D., Quinn D.I., Moreno V., Doger B., Mayer I.A., Boni V., Calvo E., Loi C., Lockhart A.C., Er-injeri J.P., Scaltriti M., Ulaner G.A., Patel J., Tang J.,*

- Beer H., Selcuklu S.D., Hanrahan A.J., Bouvier N., Melcer M., Murali R., Schram A.M., Smyth L.M., Jhaveri K., Li B.T., Drilon A., Harding J.J., Iyer G., Taylor B.S., Berger M.F., Cutler R.E., Xu F., Butturini A., Eli L.D., Mann G., Farrell C., Lalani A.S., Bryce R.P., Arteaga C.L., Meric-Bernstam F., Baselga J., Solit D.B. // *Nature*. 2018. V. 554. P. 189–194. <https://doi.org/10.1038/nature25475>
11. Ross J.S., Fakhri M., Ali S.M., Elvin J.A., Schrock A.B., Suh J., Vergilio J.-A., Ramkissoon S., Severson E., Daniel S., Fabrizio D., Frampton G., Sun J., Miller V.A., Stephens P.J., Gay L.M. // *Cancer J*. 2018. V. 124. P. 1358–1373. <https://doi.org/10.1002/cncr.31125>
12. Yang G., Cai K.Q., Thompson-Lanza J.A., Bast R.C., Liu J. // *The Journal of Biological Chemistry*. 2004. V. 279. P. 4339–4345. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311153200>
13. Hyun-Soo C., Mason K., Ramyar K.X., Stanley A.M., Gabelli S.B., Denney D.W., Leahy D.J. // *Nature*. 2003. V. 421. P. 757–760. <https://doi.org/10.1038/nature01392>
14. Mimura K., Kono K., Hanawa M., Kanzaki M., Nakao A., Ooi A., Fujii H. // *Clin. Cancer Res*. 2005. V. 11. P. 4898–4903. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2476>
15. Scheuer W., Friess T., Burtscher H., Bossenmaier B., End J., Hasmann M. // *Cancer Res*. 2009. V. 69. P. 9330–9337. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4597>
16. Tai W., Mahato R., Cheng K. J. // *Control Release*. 2010. V. 146. P. 264–275. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.04.009>
17. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
18. He W., Scharadin T.M., Saldana M., Gellner C., Hoang-Phou S., Takanishi C., Hura G.L., Tainer J.A., Carraway K.L., Henderson P.T., Coleman M.A. // *Scientific Reports*. 2015. 5. P. 12896. <https://doi.org/10.1038/srep12896>
19. Franklin M.C., Carey K.D., Vajdos F.F., Leahy D.J., de Vos A.M., Sliwkowski M.X. // *Cancer Cell*. 2004. V. 5. P. 317–328. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(04\)00083-2](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(04)00083-2)
20. Wu X., Chen S., Lin L., Liu J., Wang Y., Li Y., Li Q., Wang Z. // *Translational Oncology*. 2018. V. 11. P. 366–373. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.01.024>
21. Ceran C., Cokol M., Cingoz S., Tasan I., Ozturk M., Yagci T. // *BMC Cancer*. 2012. V. 12. P. 450–465.
22. Pernas S., Tolaney S.M. // *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2019. V. 11. P. 1–16. <https://doi.org/10.1177/1758835919833519> <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-450>
23. Duarte H.O., Balmaña M., Mereiter S., Osório H., Gomes J., Reis C.A. // *Int. J. Mol. Sci*. 2017. V. 18. P. 2262–2281. <https://doi.org/10.3390/ijms18112262>
24. Peiris D., Spector A.F., Lomax-Browne H., Azimi T., Ramesh B., Loizidou M., Welch H., Dwek M.V. // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. 43006–43017. <https://doi.org/10.1038/srep43006>

Production of Extracellular Part of Receptor ErbB2 for the Study of Immunobiologicals

V. S. Rybchenko*, #, D. S. Balabashin**, A. A. Panina**, O. N. Solopova***, ****, S. A. Yakimov**, T. K. Aliev****, D. A. Dolgikh*, **, and M. P. Kirpichnikov*, **

#Phone: +7 (977) 272-87-63; e-mail: vladislavrusia@yandex.ru

*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Leninskie gory 1/1, Moscow, 119192 Russia

**Institute of Bioorganic Chemistry RAS, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

***Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy, Simpheropolskii bul. 8, Moscow, 117638 Russia

****Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Leninskie gory 1/3, Moscow, 119234 Russia

*****Federal State Budgetary Institution “Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kashirskoe sh. 23, Moscow, 115478 Russia

In present work, we expressed in CHO cell culture the extracellular part of ErbB2 receptor (extracellular domain ErbB2), which is one of oncological markers and a target for therapeutic antibodies. The extracellular part of the receptor was recovered from culture broth by metal-affinity chromatography and was characterized using biochemical and immunochemical methods. The receptor was produced in monomer, dimer and trimer forms. Oligomer forms were separated by size-exclusion chromatography and we proved by ELISA their ability to bind “Herceptin”, which is one of the basic drugs approved for breast cancer treatment. The obtained receptor can be used for immunochemical experiments *in vitro*.

Keywords: ErbB2, CHO, trastuzumab, SK-OV-3