



УДК 547.963.32+577.21

## КОНСТРУИРОВАНИЕ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ ПЕНТАМЕРНОГО СУПЕРСПИРАЛЬНОГО ФРАГМЕНТА СОМР: II. СВОЙСТВА ГИБРИДА, СОДЕРЖАЩЕГО АНТИГЕН VNTR (MUC1) ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА

© 2004 г. С. Ю. Белицкая<sup>#</sup>, Е. Ф. Болдырева, В. Г. Коробко

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 12.09.2002 г. Принята к печати 30.09.2002 г.

С целью создания препаратов, обладающих противоопухолевой активностью, и получения высокочувствительных иммуноспецифических тестов для диагностики широкого круга опухолей человека эпителиально-клеточного происхождения сконструирован олигомерный химерный белок DB-2, содержащий иммунодоминантный участок токсина столбняка и фрагмент локуса VNTR (variable number tandem repeats) опухолеассоциированного антигена MUC1 человека. В качестве матрицы олигомеризации использован пентамерный суперспиральный фрагмент белка СОМР (cartilage oligomeric matrix protein) человека. Изучена экспрессия белка в клетках *E. coli*, разработан способ его очистки и определены основные биохимические свойства.

*Ключевые слова:* домен пентамеризации; рекомбинантные вакцины; MUC1; суперспиральные белки.

### ВВЕДЕНИЕ

Одна из основных задач иммунологии – разработка вакцин. В последние годы благодаря технологии рекомбинантных ДНК на первый план вышли исследования по созданию субъединичных рекомбинантных вакцин. Такие вакцины содержат не целые болезнетворные бактерии и вирусы, а только их отдельные белки или иммунодоминантные фрагменты этих белков. Предполагается, что такие вакцины могут быть использованы не только для предотвращения заражения инфекционными агентами, но и для лечения таких болезней, как рак. Попытки создания рекомбинантных противораковых вакцин базируются на способности опухолевых клеток экспрессировать уникальные антигены, способные индуцировать специфический иммунный ответ [1–5].

Большинство противораковых вакцин, протестированных к настоящему времени в клинических условиях, созданы с использованием целых опухолевых клеток, однако активно разрабатываются подходы, обеспечивающие вакцинацию с применением специфических антигенов. Очевидно,

но, что иммунный ответ на антигены, ассоциированные с опухолью, будет значительно более специфичным по сравнению с ответом на целую клетку [3, 6].

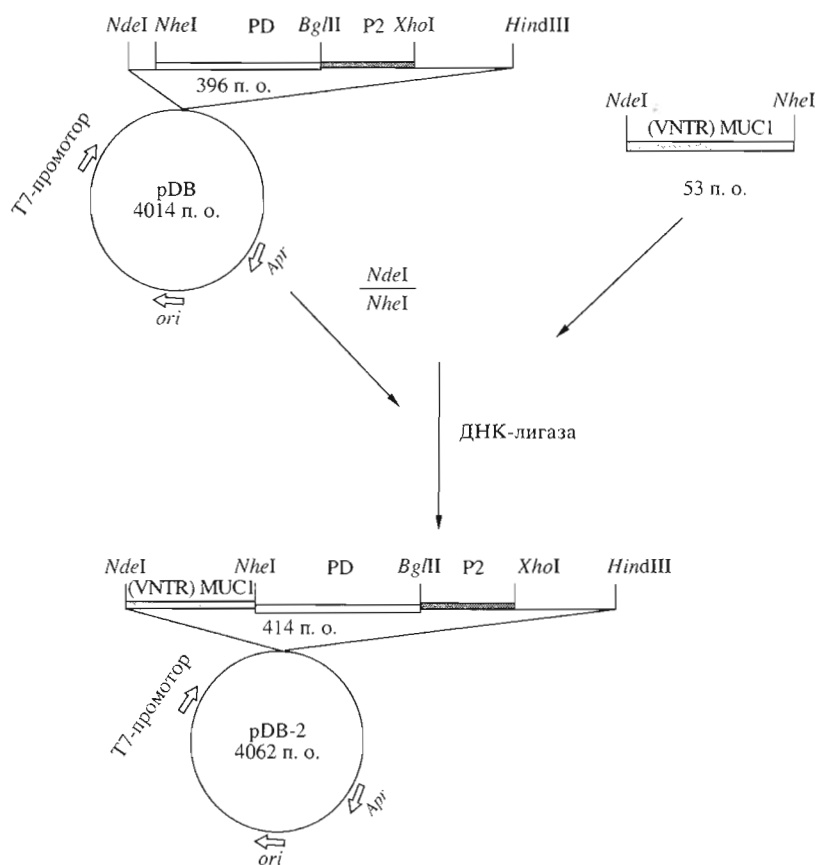
Проблема выявления эффективных опухолеассоциированных антигенов – одна из основных при разработке противораковых вакцин. Все идентифицированные на сегодняшний день опухолевые антигены можно разделить на четыре категории: 1) уникальные антигены, являющиеся продуктами мутаций и экспрессирующиеся только в клетках одной опухоли; 2) частично специфические антигены, экспрессирующиеся в клетках многих опухолей, но не в здоровых тканях; 3) тканеспецифические антигены, экспрессирующиеся в норме в том виде ткани, из которого произошла данная опухоль (в трансформированных клетках эти молекулы экспрессируются или в существенно большем количестве по сравнению со здоровыми клетками, или в негликозилированной форме); 4) продукты онкогенов и поврежденных генов-супрессоров опухолей.

Очевидно, для создания вакцин могут быть полезны только антигены трех последних категорий, так как использование уникальных опухолеассоциированных антигенов первой категории потребовало бы создания вакцины для каждого конкретного больного [4, 7].

Сообщение I см. [1].

Сокращение: VNTR (variable number tandem repeats) – локус мицина MUC1 человека с изменяющимся числом тандемных повторов.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 330-69-83; эл. почта: lap08@mail.ru).



**Рис. 1.** Схема конструирования экспрессионной плазмиды pDB-2. PD – домен пентамеризации (показан светлым прямоугольником), P2 – иммунодоминантный участок токсина столбняка (черный прямоугольник), (VNTR) MUC1 – фрагмент локуса VNTR муцина MUC1 человека (серый прямоугольник).

В настоящее время активно разрабатываются противораковые вакцины с использованием различных антигенов, ассоциированных с опухолями. В состав современных противоопухолевых вакцин могут входить или отдельные рекомбинантные белки, состоящие из специфических опухолеассоциированных антигенов, или вирусные и бактериальные векторы, обеспечивающие синтез необходимых антигенов уже в организме больного [3, 8–10].

Цель настоящей работы – конструирование олигомерного белка, включающего В- и Т-клеточные эпитопы и обладающего высокой иммуногенностью. Предполагается, что иммуногенность белка будет обусловлена его олигомерной структурой, обеспечивающей одновременное представление большого числа одинаковых Т- и В-клеточных эпитопов. Такой белок может стать исходным продуктом для создания терапевтической вакцины против рака.

Как и в работе [1], для создания целевого рекомбинантного белка в качестве матрицы олигомеризации мы использовали фрагмент белка

COMP (cartilage oligomeric matrix protein) человека (остатки 28–77), способный образовывать ригидные пентамерные супер- $\alpha$ -спиральные (coiled coil) структуры, и иммунодоминантный участок токсина столбняка P2 (остатки 828–846) в качестве универсального Т-клеточного эпитопа. Очевидно, что специфичность вакцины будет во многом определяться входящим в ее состав В-клеточным эпитопом. В качестве нового модельного В-клеточного эпитопа мы выбрали опухолеассоциированный антиген третьей категории, представляющий собой негликозилированный фрагмент из 15 а.о. локуса VNTR (variable number tandem repeats) муцина человека MUC1. Предполагается, что белок, обеспечивающий значительный иммунный ответ на MUC1, обладает противоопухолевой активностью или может использоваться для диагностики опухолей эпителиально-клеточного происхождения [11–17].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Получение экспрессирующей конструкции.* Первым этапом работы явилось создание плазми-

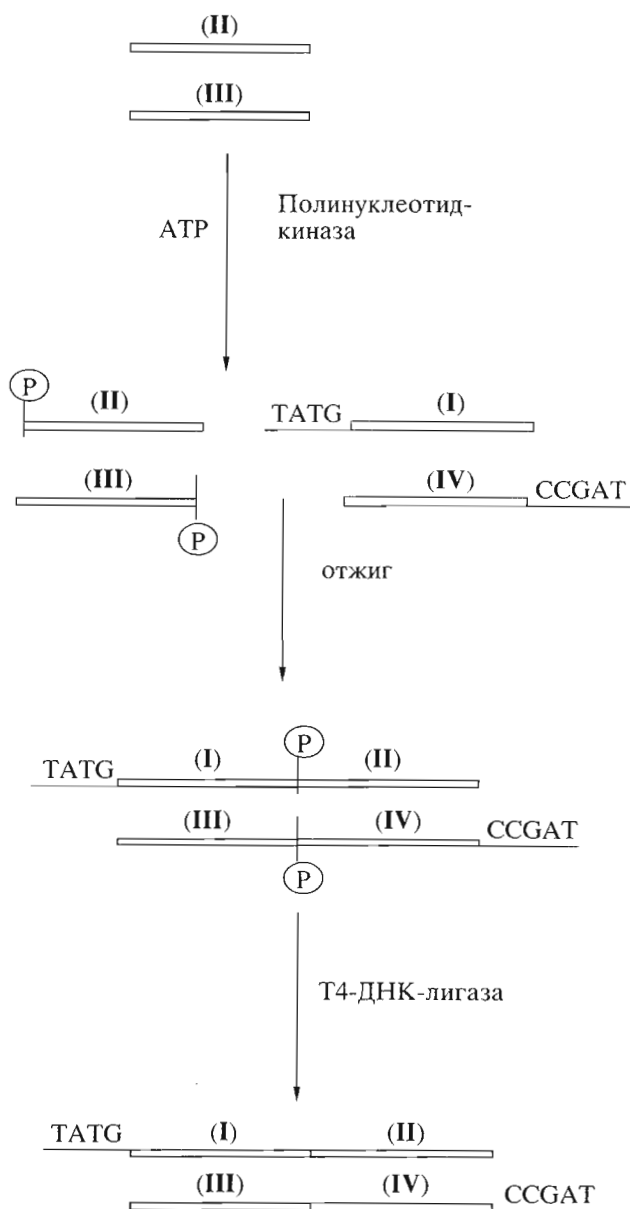


Рис. 2. Схема создания фрагмента ДНК, кодирующего locus VNTR муцина MUC1 человека.

ды для экспрессии мономера рекомбинантного белка с предполагаемой противоопухолевой активностью. Для этого полученную ранее плазмиду pDB [1] обрабатывали рестриктазами *NdeI/NheI* и лигировали с фрагментом, кодирующим VNTR-locus белка MUC1 человека (рис. 1). Фрагмент ДНК локуса VNTR получали путем отжига дезоксиолигонуклеотидов (I), (II) и (III), (IV), кодирующих “плюс”- и “минус”-цепи дуплекса и содержащих сайты клонирования *NdeI* и *NheI* на 5'- и 3'-концах целевого дуплекса соответственно (рис. 2).

TATGAGCCACGGTGTACCTCTGCTCC (I);

GGATACTCGTCCCTGCTCCAGGTTCTG (II);

CTAGCAGAACCTGGAGCAGGACG (III);

AGTATCCGGAGCAGATAACACCGTGGCTCA (IV).

В итоге была получена плаزمида pDB-2.

Плазмида pDB-2 кодирует рекомбинантный белок DB-2, содержащий в качестве B-клеточно-го эпитопа фрагмент муцина человека MUC1. MUC1 является опухолеассоциированным антигеном третьей категории. Это – трансмембранный гликопротеин, представленный на апикальной поверхности большинства клеток простого эпителия, выступающего полости различных органов: легких, молочных и слюнных желез, яичников, поджелудочной железы. Характерной структурной особенностью данного белка является наличие обширного внеклеточного домена, состоящего из переменного количества тандемных повторов из 20 а.о. – VNTR (variable number tandem repeats). Повтор содержит остатки серина, треонина и пролина и сильно O-гликозилирован [11–13].

MUC1 экспонирован не только на поверхности клеток нормального эпителия, но также и на мембране многих опухолевых клеток, включая клетки опухоли молочной железы, поджелудочной железы, толстого кишечника и др. Единственным, но крайне важным отличием белка MUC1 раковых клеток от MUC1 здоровых клеток является то, что он полностью дегликозилирован. В результате тандемные повторы оказываются экспонированными наружу и служат хорошей мишенью для иммунной системы организма, которая в норме сталкивается только с гликозилированной формой белка [11–14]. Высокая иммуногенность дегликозилированной формы белка MUC1 является предпосылкой для возможности использования его при создании иммунотерапевтической вакцины [15].

Было установлено, что искусственный белок, содержащий пять повторов из 20 а.о. локуса VNTR MUC1, способен полностью имитировать полноразмерный дегликозилированный MUC1 и обеспечивать выработку значительного количества антител против данного белка [14, 15]. В то же время иммунотерапевтическое использование полипептида из шести повторов того же локуса MUC1, по-видимому, невозможно из-за развития T-клеточной аллергии и иммуносупрессии [16].

Так как существует ряд данных, свидетельствующих о том, что белок, включающий в себя более короткие фрагменты локуса VNTR MUC1, также может обеспечивать выработку антител, специфически распознающих негликозилированным муцином. В нашей работе мы использовали для каждого мономера рекомбинантного белка

DB-2 фрагмент локуса VNTR MUC-1 из 19 а.о.: MSHGVT SAPDTRPAPGSAS [17].

Таким образом, в ходе настоящей работы была получена плаزمида рDB-2, кодирующая рекомбинантный белок DB-2 с потенциальной противораковой активностью, по принципу построения аналогичный рекомбинантному белку DB-1 с потенциальной противомаларийной активностью [1].

Структура рекомбинантного белка приведена на рис. 3.

**Экспрессия и очистка рекомбинантного белка DB-2.** Плазмидой рDB-2 трансформировали клетки *E. coli* BL21 (DE3). Рекомбинантный белок с расчетной молекулярной массой 14,9 кДа был обнаружен в растворимой форме (рис. 4, дорожка 3).

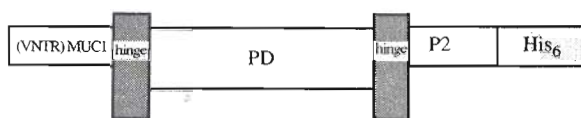
Из рис. 4 видно, что рекомбинантный белок DB-2 при SDS-электрофорезе обладает аномальной подвижностью. Этот факт можно объяснить наличием в структуре белка значительного количества слабоструктурированных шарнирных участков, богатых пролином. У данного белка была определена N-концевая аминокислотная последовательность MSHGVT S, полностью совпадающая с заданной.

Гибридный белок выделяли из смеси цитоплазматических белков металлоаффинной хроматографией на Ni-IDA-сефарозе. Выход DB-2 составил 20 мг с 1 г бактериального осадка.

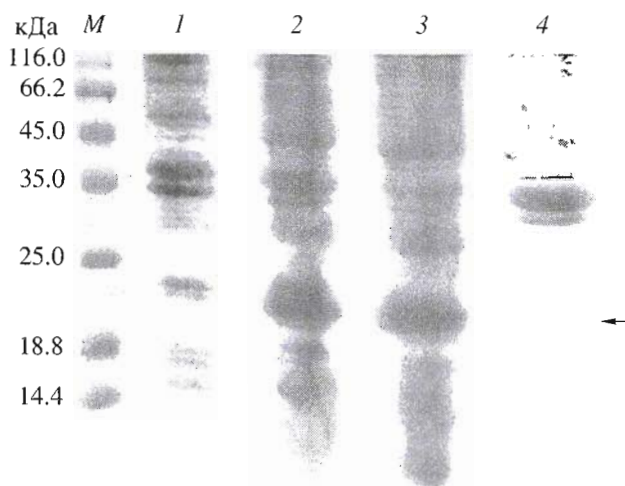
**Свойства рекомбинантного белка.** Ввиду того, что основная задача настоящей работы – создание олигомерного рекомбинантного белка, потенциально способного многократно увеличивать эффективность представления различных антигенных детерминант, входящих в состав мономера, необходимо было выяснить степень олигомеризации полученного гибридного белка. Как видно из рис. 5, в растворе большая часть рекомбинантного белка находится в состоянии пентамера. Кроме того, имеются олигомеры более низкого порядка.

Для получения более детальной характеристики рекомбинантного белка был снят спектр КД. Полученные данные свидетельствуют о том, что в растворе 62% аминокислотной последовательности DB-2 представлено α-спиральными участками. Эти результаты хорошо согласуются с теоретическими расчетами для пентамерной формы белка, предполагающими, что около 60% аминокислотной последовательности гибридного белка должно образовывать спиральные участки (таблица).

Таким образом, получен штамм-продуцент *E. coli* для рекомбинантного белка DB-2 и получен рекомбинантный белок DB-2, который является пентамерной молекулой, содержащей на C-конце иммунодоминантный участок токсина столбняка P2, а на N-конце – негликозилирован-



**Рис. 3.** Схематическое изображение мономера рекомбинантного белка DB-1 (PD – домен пентамеризации, hinge – шарнирные участки из IgA человека, (VNTR) MUC1 – В-клеточный эпитоп, P2 – Т-клеточный эпитоп, His<sub>6</sub> – последовательность, содержащая шесть гистидинов).



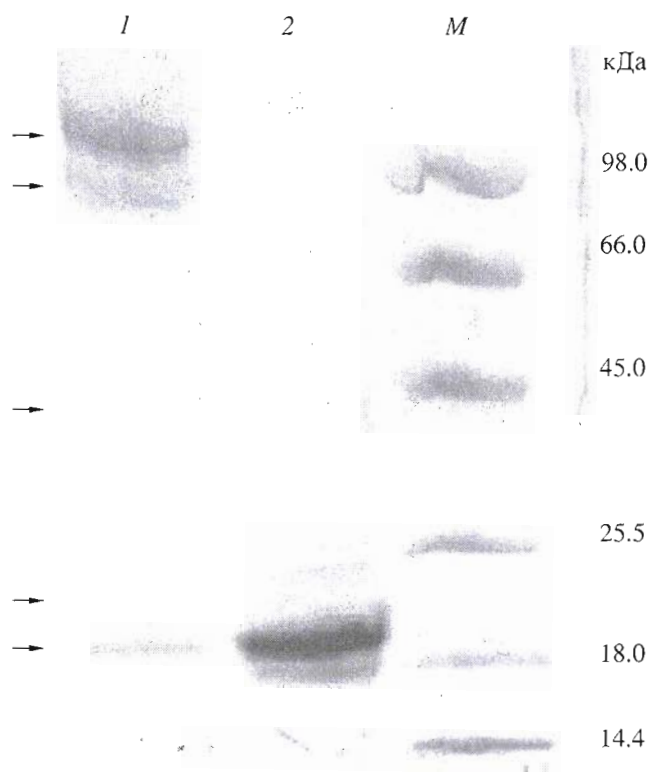
**Рис. 4.** SDS-электрофорез в 13,5% ПААГ: проба суммарного белка клеток *E. coli* BL21 (DE3) с плазмидой рDB-2 без индукции IPTG (1) и после индукции IPTG (2); проба суммарного белка растворимой (3) и нерастворимой фракции (4) белка тех же клеток с плазмидой рDB-2 (клетки разрушены ультразвуком). Стрелкой показан белок DB-2.

ный фрагмент опухолеассоциированного антигена MUC1 человека.

Полученный рекомбинантный белок может быть использован в качестве исходного продукта для создания лекарств с потенциальной противопухоловой активностью, а также для получения

Содержание различных элементов вторичной структуры в рекомбинантном белке DB-2 (по данным КД)

Тип вторичной структуры	Содержание данного элемента вторичной структуры в рекомбинантном белке, %
α-Спираль	62 ± 3
β-Структура	25 ± 3
Неструктурированные участки	13 ± 3



**Рис. 5.** SDS-электрофорез в 10% ПААГ рекомбинантного белка DB-2 без меркаптоэтанола (1) и в присутствии меркаптоэтанола (2). Стрелками показан белок DB-2.

иммуноспецифических тестов для диагностики широкого круга опухолей человека эпителиально-клеточного происхождения.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы, ферменты, бактериальные штаммы и плазмиды,** используемые в настоящей работе, аналогичны материалам работы [1].

**Конструирование плазмид.** Плазмиду рДВ, полученную в ходе работы [1], расщепляли рестриктазами *NdeI/NheI*. Выделенный из 1% геля агарозы вектор лигировали с фрагментом муцина человека MUC1 [11–17] для создания плазмиды рДВ-2. Для создания фрагмента ДНК, кодирующего VNTR-локус муцина человека, дезоксирибонуклеотиды (II) и (III) фосфорилировали с помощью полинуклеотидкиназы 30 мин при 12°C в присутствии АТФ. Затем объединяли вместе дезоксирибонуклеотиды (I)–(IV) и подвергали их отжигу: 2 мин 65°C и медленное охлаждение до 12°C. После отжига дезоксирибонуклеотиды лигировали – 4 ч, 12°C. Далее проводили совместное лигирование вектора и фрагмента – 4 ч, 12°C. Лигазной смесью вектора и фрагмента трансформи-

ровали клетки *E. coli* XL1 и аликвоту высевали на твердую питательную среду. Отбор клонов производили как в работе [1]. Окончательно структуру участка плазмиды рДВ-2, кодирующую рекомбинантный белок, определяли секвенированием по Сенгеру [18] с использованием универсальных праймеров – Т7-прямого – АААТАСГАСТСАС-ТАТАГГ, и Т7-обратного – ССТАГТТАТТГСТ-САСГСГ.

**Экспрессия и очистка рекомбинантного белка.** Рекомбинантный белок DB-2 был экспрессирован в клетках *E. coli* BL21 (DE3). Выделение и очистка рекомбинантного белка проводились как описано в работе [1]. Все дальнейшие исследования свойств рекомбинантного белка DB-2, включающие изучение его электрофоретической подвижности и спектра КД, проводились согласно методикам работы [1].

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны В.В. Месянжинову за помощь в подготовке рукописи и благодарят проф. Ж.-П. Мака (Институт биохимии университета Лозанны, Швейцария) за предоставленную плазмиду рDLMNH3, а также Н.С. Быстрова за синтез олигонуклеотидных праймеров.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белицкая С.Ю., Болдырева Е.Ф., Коробко В.Г. // Биоорган. химия. 2003. Т. 30. С. 41–47.
2. Ben-Yedidia T., Arnon R. // Curr. Opin. Biotech. 1997. V. 8. P. 442–448.
3. Pardoll D.M. // Nature Med. 1998. V. 4. P. 525–531.
4. Clair N.S., Shenoy B., Jacob L.D., Margolin A.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 9469–9474.
5. Seder R.A., Hill A.V.S. // Nature. 2000. V. 406. P. 793–798.
6. Mateo L., Gardner J., Chen Q., Schmidt C., Pown M., Elliott S.L., Dye S.J., Firat H., Lemonier F.A., Cebon J., Suhrbier A. // J. Immunol. 1999. V. 163. P. 4058–4063.
7. Newton G., Weremowicz S., Morton C.C., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Lawler J. // Genomics. 1994. V. 24. P. 435–439.
8. Kovacovics-Bankowski M., Rock K.L. // Science. 1995. V. 267. P. 243–246.
9. Albert M.L., Sauter B., Bhardwaj J. // Nature. 1998. V. 392. P. 86–89.
10. Chen P.W. // J. Immunol. 1996. V. 156. P. 224–231.
11. Gendler S.J., Lancaster C.A., Taylor-Papadimitriou J., Duhig T., Peat N., Burchell J., Pemberton L., Lalani E.-N., Wilson D. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 15286–15293.
12. Gendler S.J., Taylor-Papadimitriou J., Puhig T., Rothbard J., Burchell J. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 12820–12823.

13. Kotera Y., Fontenot J.P., Pecher G., Metzgar V., Finn O.J. // *Cancer Res.* 1994. V. 54. P. 2856–2860.
14. Zhang S., Graeber L.A., Helling F., Raqupathic G., Adluri S., Lloyd K.O., Livingsten P.O. // *Cancer Res.* 1996. V. 53. P. 3315–3319.
15. Agrawal B., Krantz M.J., Reddish M.A., Longenecker B.M. // *Nature Med.* 1998. V. 4. P. 43–49.
16. Liu X., Sejbal J., Kotovych G., Koganty R.R., Reddish M.A., Jackson L., Gandhi S.S., Mendonca A.J., Longenecker B.M. // *Glycoconj. J.* 1995. V. 12. P. 607–617.
17. Avichezer D., Taylor-Papadimitriou J., Arnon R. // *Cancer Biochem. Biophys.* 1998. V. 13. P. 113–128.
18. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.K. // *J. Mol. Biol.* 1975. V. 94. P. 441–446.

## Design of Chimeric Proteins on the Basis of a Pentameric Superhelical Fragment of Human Cartilage Oligomeric Matrix Protein: II. The Properties of a Hybrid Containing the Antigen VNTR (MUC1) from Human Tumors

S. Yu. Belitskaya<sup>#</sup>, E. F. Boldyreva, and V. G. Korobko

<sup>#</sup>Phone: +7 (095) 330-6983; e-mail: lap08@mail.ru

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

An oligomeric chimeric protein DB-2 was constructed, to design drugs with antitumor activity and to develop highly sensitive immunospecific tests for the diagnostics of a wide variety of malignant epithelial cells in humans. DB-2 contains an immunodominant site of tetanus toxin and a fragment of the locus of the human tumor-associated antigen MUC1 with a variable number of tandem repeats. A pentameric superhelical fragment of the human cartilage oligomeric matrix protein was used as an oligomerization matrix. The expression of the protein in *Escherichia coli* cells was studied, a method for its purification was developed, and its main biochemical properties were determined. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* coiled-coil proteins, pentamerization domain, recombinant vaccines, MUC1