

УДК 577.29

Интернализация и рециркуляция рецептора HER2 при взаимодействии адресного фототоксичного белка DARPIn-miniSOG с клетками аденокарциномы молочной железы человека

О. Н. Шилова*, Г. М. Прошкина, Е. Н. Лебедеико, С. М. Деев

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

*E-mail: olga.shilova.n@gmail.com

Поступила в редакцию 10.05.2015

РЕФЕРАТ Разработка и исследование новых высокоаффинных белковых соединений, способных избирательно и эффективно уничтожать раковые клетки человека, являются актуальной задачей современных биомедицинских исследований. В работе изучена способность рекомбинантного фототоксичного белка DARPIn-miniSOG взаимодействовать с клетками аденокарциномы молочной железы человека, гиперэкспрессирующими рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (HER2). Установлено, что адресный фототоксин DARPIn-miniSOG специфически взаимодействует с рецептором HER2 и вызывает его интернализацию, за которой следует медленный возврат рецептора на клеточную мембрану. Выяснение характера взаимодействия белка DARPIn-miniSOG с рецептором является важным условием для дальнейшей разработки методов воздействия на HER2-положительные опухоли с использованием данного фототоксина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА адресные фототоксичные белки, интернализация, каркасные белки, рециркуляция, рецептор HER2, DARPIn.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HER2 – рецептор 2 эпидермального фактора роста человека; PBS – фосфатно-солевой буфер; scFv – одноцепочечный вариабельный фрагмент антител; DARPIn – искусственный белок с анкириновыми повторами (Designed Ankyrin Repeat Protein); IPTG – изопропилтио-β-D-галактопиранозид.

ВВЕДЕНИЕ

Моноклональные антитела и их производные широко используются в биомедицинской практике для селективного, прицельного поражения опухолевых новообразований человека [1, 2]. Вместе с тем, успехи в разработке методов получения неприродных белков, высокоаффинных к специфическим мишеням (создание синтетических библиотек, разработка эффективных технологий отбора белков, высокоаффинных к специфической мишени), позволили создать новые, так называемые каркасные белки (скаффолды) неиммуноглобулиновой природы с единым основным каркасом и возможностью варьировать специфичность по отношению к мишени [3–5]. Зачастую каркасные белки, обладая такой же высокой аффинностью и специфичностью к мишени, как соответствующие моноклональные антитела, превосходят их по своим физико-химическим свойствам.

Так, для каркасных белков характерно отсутствие агрегации, небольшой размер, обеспечивающий эффективное проникновение в ткани, быстрый фолдинг и высокая химическая, протеолитическая и термическая стабильность. Возможность получения нужного каркасного белка с единственным остатком цистеина в его составе облегчает последующую конъюгацию с цитотоксинами, флуорофорами или наночастицами, а отсутствие дисульфидных связей позволяет экспрессировать эти белки в цитоплазме *Escherichia coli* и нарабатывать белки, высокоаффинные к конкретной мишени, без иммунизации животных. Перечисленные особенности дают каркасным белкам неоспоримые преимущества перед иммуноглобулинами в качестве альтернативных адресных компонентов в составе мультифункциональных соединений, предназначенных для диагностики и терапии различных заболеваний.

К каркасным белкам, представляющим альтернативу моноклональным антителам, относятся аднектины, аффибоды, антикалины, а также искусственные белки, сконструированные на основе природных белков с повторяющимися структурными мотивами (анкириновые и тетратрикопептидные повторы) [3–5].

В лаборатории А. Плюктуна на основе искусственных белков с анкириновыми повторами – DARPin (Designed Ankyrin Repeat Proteins), получен ряд белков, обладающих высокой аффинностью к рецептору 2 эпидермального фактора роста человека HER2 (ERBB2) [6].

Поверхностный клеточный рецептор HER2 сверхэкспрессируется в 20–30% опухолей молочной железы и яичников [7, 8]. Как правило, сверхэкспрессия этого рецептора коррелирует с агрессивным фенотипом опухоли и активным метастазированием [9], что делает его привлекательной мишенью для иммунотерапии рака, поскольку в норме HER2 экспрессируется лишь в небольших количествах на поверхности эпителиальных клеток. Таким образом, создание и исследование новых высокоаффинных белковых соединений, способных избирательно и эффективно уничтожать раковые клетки, сверхэкспрессирующие HER2, остаются актуальной задачей.

В своей работе мы использовали DARPin₉₋₂₉ в качестве адресного домена, способного доставить к HER2-положительным клеткам аденокарциномы молочной железы человека фототоксический белок miniSOG [10].

Цель данного исследования состояла в изучении способности гибридного белка DARPin-miniSOG взаимодействовать с опухолевыми клетками, сверхэкспрессирующими HER2, и возможности интернализации образующегося комплекса HER2/DARPin-miniSOG.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии и условия культивирования

Культивируемые клетки аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, сверхэкспрессирующие HER2, и клетки яичников китайского хомячка CHO растили в среде McCoy's 5A (Life technologies, США) с 10% эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота (HyClone, Бельгия) в атмосфере 5% CO₂ при 37°C.

Получение белка DARPin-miniSOG

Кодирующую последовательность адресного модуля DARPin₉₋₂₉ амплифицировали с плазмиды pCG-Hnse-DARPin-d18-9-29 (любезно предоставлена А. Плюктуном, Университет Цюриха). ПЦР-

фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NdeI и HindIII и лигировали с вектором pET22b, предварительно обработанным этими же эндонуклеазами рестрикции. Кодирующую последовательность цитотоксического модуля miniSOG амплифицировали с плазмиды pSD-4D5scFv-miniSOG [11], обрабатывали эндонуклеазами рестрикции HindIII и XhoI и клонировали в вектор pET22b в одной рамке считывания с кодирующей последовательностью DARPin₉₋₂₉. В результате экспрессионная кассета содержала индуцибельный промотор фага T7, последовательности, кодирующие DARPin₉₋₂₉, miniSOG и олигогистидиновый пептид.

Белок DARPin-miniSOG экспрессировали в штамме BL21(DE3). Экспрессию индуцировали 1 mM IPTG при достижении культурой OD₆₀₀ = 0.5–0.7. После индукции биомассу растили при 25°C в течение 8 ч. Белок DARPin-miniSOG выделяли из растворимой фракции с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии согласно протоколу производителя.

Проточная цитофлуориметрия

Опыты по проточной цитофлуориметрии выполняли на проточном цитометре BD Accuri C6 (Becton Dickinson, США). Адгезивные клетки снимали с подложки раствором Версена («ПанЭко», Россия) и промывали фосфатно-солевым буфером (PBS, «ПанЭко», Россия). Для определения субпопуляций живых и мертвых клеток пробу инкубировали в 100 мкл PBS с йодидом пропидия (конечная концентрация 2.5 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США) в темноте на льду в течение 5 мин. Для каждого образца собирали не менее 10⁴ событий. При измерении последовательно выделяли популяции одиночных клеток, затем живых клеток (не окрашенных йодидом пропидия). Для детекции использовали следующие параметры: напряжение на лазере 20 мВт и фильтры 533/30 (FL1-канал) для детекции флуоресценции DARPin-miniSOG, 585/40 (FL2-канал) для детекции флуоресценции йодида пропидия. Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения BD Accuri C6.

Конкурентный анализ

Специфичность связывания рекомбинантного белка DARPin-miniSOG с клеточным рецептором HER2 определяли по уровню флуоресценции HER2-сверхэкспрессирующих клеток, окрашенных белком DARPin-miniSOG, с помощью проточной цитофлуориметрии в отсутствие и в присутствии конкурирующего агента. Клетки линии SK-BR-3, достигшие конfluence, снимали с подложки раствором Версена, промывали дважды PBS. На один опыт

брали $\sim 10^5$ клеток. Клетки инкубировали с белком DARPIn-miniSOG (500 нМ) на льду в течение 30 мин, затем дважды отмывали раствором PBS от несвязавшегося белка и анализировали уровень флуоресценции в канале FL1 (зеленая флуоресценция). В качестве параметра интенсивности флуоресценции в работе использовали среднее значение интенсивности флуоресценции Mean FL1. В качестве конкурирующего агента использовали DARPIn_9-29 в эквивалентной концентрации. В качестве отрицательного контроля использовали анти-HER2-мини-антитело 4D5scFv, специфичное к другому эпитопу HER2.

Оценка интернализации HER2 при взаимодействии с DARPIn-miniSOG

Клетки SK-BR-3 выращивали в течение 14 ч на среде McCoy's 5A (Life technologies, США), содержащей 1% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Бельгия). Культуральную среду удаляли, клетки снимали с пластика и дважды промывали стерильным PBS. Суспензию клеток в количестве 4×10^5 в течение 30 мин инкубировали на льду в 250 мкл 1 мкМ раствора DARPIn-miniSOG в PBS, осаждали центрифугированием на охлажденной центрифуге в течение 5 мин при 800g, однократно промывали холодным PBS и делили на четыре части. Первую из них использовали для измерения уровня флуоресценции клеток, окрашенных белком DARPIn-miniSOG при 4°C. Для контроля уровня базовой аутофлуоресценции клеток использовали клетки, не инкубированные с белком DARPIn-miniSOG.

Остальные три части суспензии клеток (по 1×10^5 клеток в каждой), однократно окрашенных белком DARPIn-miniSOG при 4°C, помещали в среде McCoy's с 1% сывороткой в 24-луночный планшет и оставляли в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ при 37°C до следующего измерения. Через 4, 8 и 12 ч после первого измерения клетки второй, третьей и четвертой части соответственно снимали с пластика раствором Версена, дважды промывали PBS, половину оставляли для контроля уровня базовой флуоресценции, вторую половину инкубировали в течение 30 мин в 50 мкл 1 мкМ раствора DARPIn-miniSOG на льду. После окончания инкубации клетки однократно промывали холодным PBS. Флуоресценцию DARPIn-miniSOG измеряли в обеих полученных пробах для каждого временного интервала.

Оценка динамики окраски белком DARPIn-miniSOG клеток SK-BR-3, обработанных папаином

Клетки SK-BR-3 выращивали в течение 14 ч на среде McCoy's 5A (Life technologies, США), содержащей 1% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Бельгия). Культуральную среду удаляли, клетки

снимали с пластика и дважды промывали стерильным PBS. Для удаления внеклеточного домена HER2 суспензию клеток 1.5×10^6 инкубировали в 1% растворе папаина (AppliChem, Германия) при 37°C в течение 15 мин. Клетки промывали холодным PBS, делили на семь частей. Первую часть (нулевой момент времени) делили пополам, одну половину ($\sim 12.5 \times 10^4$ клеток) окрашивали белком DARPIn-miniSOG (1 мкМ) при 4°C, вторая половина клеток служила контролем уровня аутофлуоресценции. Оставшиеся пять частей клеток помещали в среде McCoy's с 1% сывороткой в 24-луночный планшет и оставляли в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ при 37°C на 2, 4, 8, 12, 24 и 72 ч. По истечении указанного временного периода клетки снимали с подложки раствором Версена, промывали холодным PBS, делили пополам, одну половину окрашивали белком DARPIn-miniSOG, как описано выше, вторую оставляли неокрашенной и проводили измерение флуоресценции двух проб для каждого временного интервала.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в лаборатории С.М. Деева (ИБХ РАН) был создан адресный белок DARPIn-miniSOG для селективного фотодинамического поражения раковых клеток человека. Адресная часть DARPIn-miniSOG представлена белком неиммуноглобулиновой природы DARPIn_9-29, обладающим высоким сродством к рецептору HER2 [6]. В отличие от часто используемого анти-HER2-мини-антитела 4D5scFv, которое взаимодействует с субдоменом IV внеклеточного домена HER2, DARPIn_9-29 узнает субдомен I того же HER2 [12]. В качестве цитотоксического модуля в рекомбинантном белке DARPIn-miniSOG использован генно-инженерный флавопротеин miniSOG [10], способный под действием синего света генерировать активные формы кислорода. Возбуждение miniSOG синим светом приводит к эмиссии в зеленой области спектра ($\lambda_{\max} = 500$ нм), что позволяет прямо детектировать связывание белка с клетками методом проточной цитофлуориметрии.

Созданный рекомбинантный адресный фототоксин DARPIn-miniSOG проявляет фотоиндуцированную цитотоксичность на HER2-положительных клеточных линиях *in vitro*, вызывая некроз клеток, подвергнутых облучению.

Представлялось необходимым изучить особенности взаимодействия гибридного белка DARPIn-miniSOG с опухолевыми клетками, сверхэкспрессирующими HER2, и оценить влияние цитотоксического модуля в составе гибридного белка на способность адресного домена DARPIn_9-29 специфически связываться с рецептором HER2.

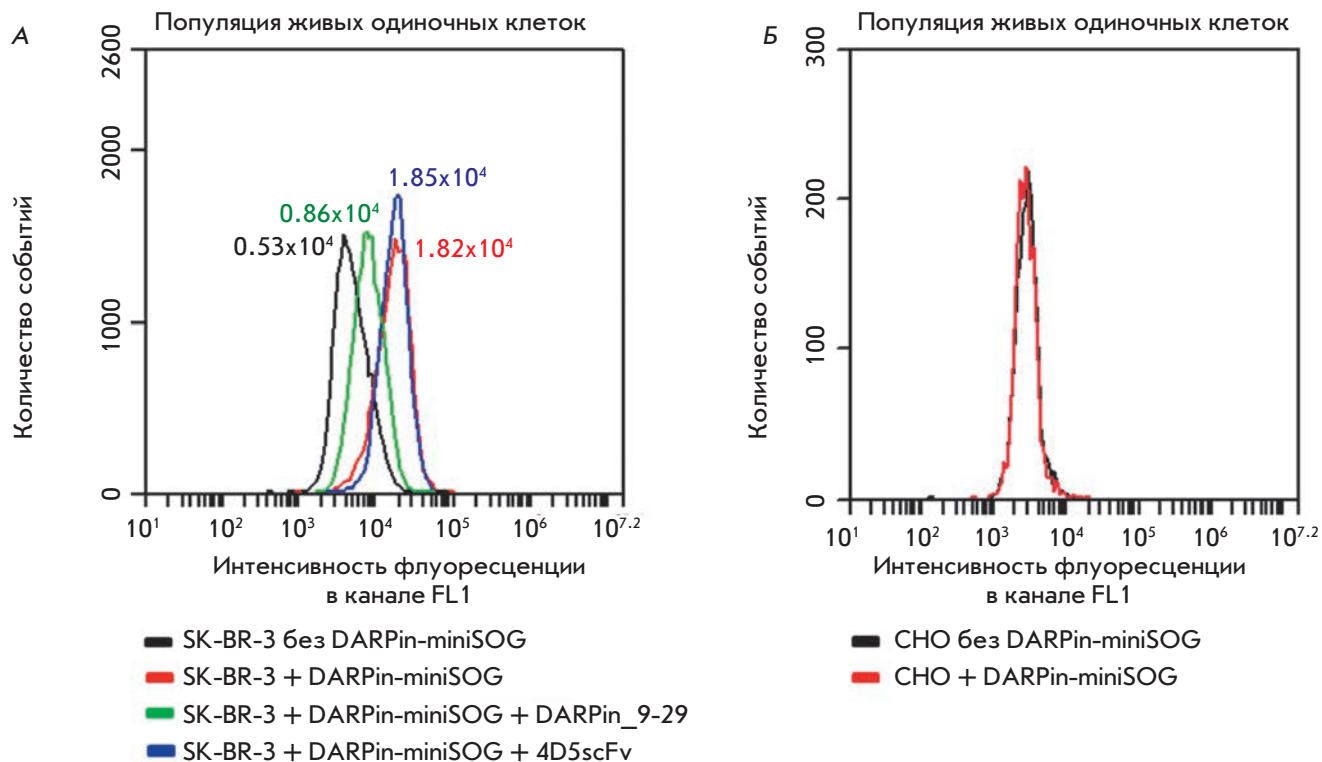


Рис. 1. Оценка способности белка DARPIn-miniSOG специфически взаимодействовать с клетками аденокарциномы молочной железы SK-BR-3, сверхэкспрессирующими рецептор HER2. А – гистограмма распределения флуоресценции HER2-положительных клеток SK-BR-3, обработанных: белком DARPIn-miniSOG (красная линия), DARPIn-miniSOG в присутствии конкурентного полипептида DARPIn_9-29 (зеленая линия), DARPIn-miniSOG в присутствии неконкурентного мини-антитела 4D5scFv, специфичного к HER2 (синяя линия), и аутофлуоресценции неокрашенных клеток SK-BR-3 (черная линия). Рядом с пиками соответствующим цветом указано численное значение флуоресцентного сигнала в зеленом канале (Mean FL1-A). Б – гистограмма распределения флуоресценции HER2-отрицательных клеток CHO, обработанных белком DARPIn-miniSOG (красная линия), и аутофлуоресценции неокрашенных клеток CHO (черная линия)

Для оценки специфичности взаимодействия DARPIn_9-29 в составе гибридного белка с HER2 мы исследовали эффективность окрашивания клеток SK-BR-3, экспрессирующих рецептор HER2 в количестве $\sim 10^6$ молекул на клетку, гибридным флуоресцентным белком DARPIn-miniSOG с использованием метода конкурентного ингибирования. В качестве конкурирующего агента использовали свободный полипептид DARPIn_9-29. Клетки SK-BR-3 инкубировали с белком DARPIn-miniSOG (500 нМ) или с эквимолярной смесью белка DARPIn-miniSOG (500 нМ) и конкурирующего агента DARPIn_9-29 (500 нМ). Для оценки уровня флуоресценции клетки SK-BR-3 инкубировали с белком при температуре 4°C, что исключает возможность интернализации комплекса рецептор-белок.

Было показано, что средняя интенсивность флуоресценции клеток, обработанных белком DARPIn-miniSOG, почти в 2 раза выше, чем интенсивность

флуоресценции клеток, обработанных смесью белков DARPIn_9-29 и DARPIn-miniSOG (рис. 1А, красная и зеленая линии соответственно), т.е. полипептид DARPIn_9-29 конкурирует с белком DARPIn-miniSOG за связывание с клетками SK-BR-3. Отметим, что при использовании мини-антитела 4D5scFv, узнающего на поверхности HER2 эпитоп, отличный от эпитопа DARPIn_9-29, снижения в значении флуоресценции не происходит (рис. 1А, синяя линия). HER2-отрицательные клетки CHO не дают флуоресцентного сигнала при инкубации с белком DARPIn-miniSOG (рис. 1Б). Таким образом, установлено, что адресный гибридный белок DARPIn-miniSOG высокоспецифично связывается с клетками аденокарциномы молочной железы, сверхэкспрессирующими рецептор HER2, а присутствие в его составе цитотоксического модуля miniSOG не влияет на специфичность адресного домена по отношению к HER2.

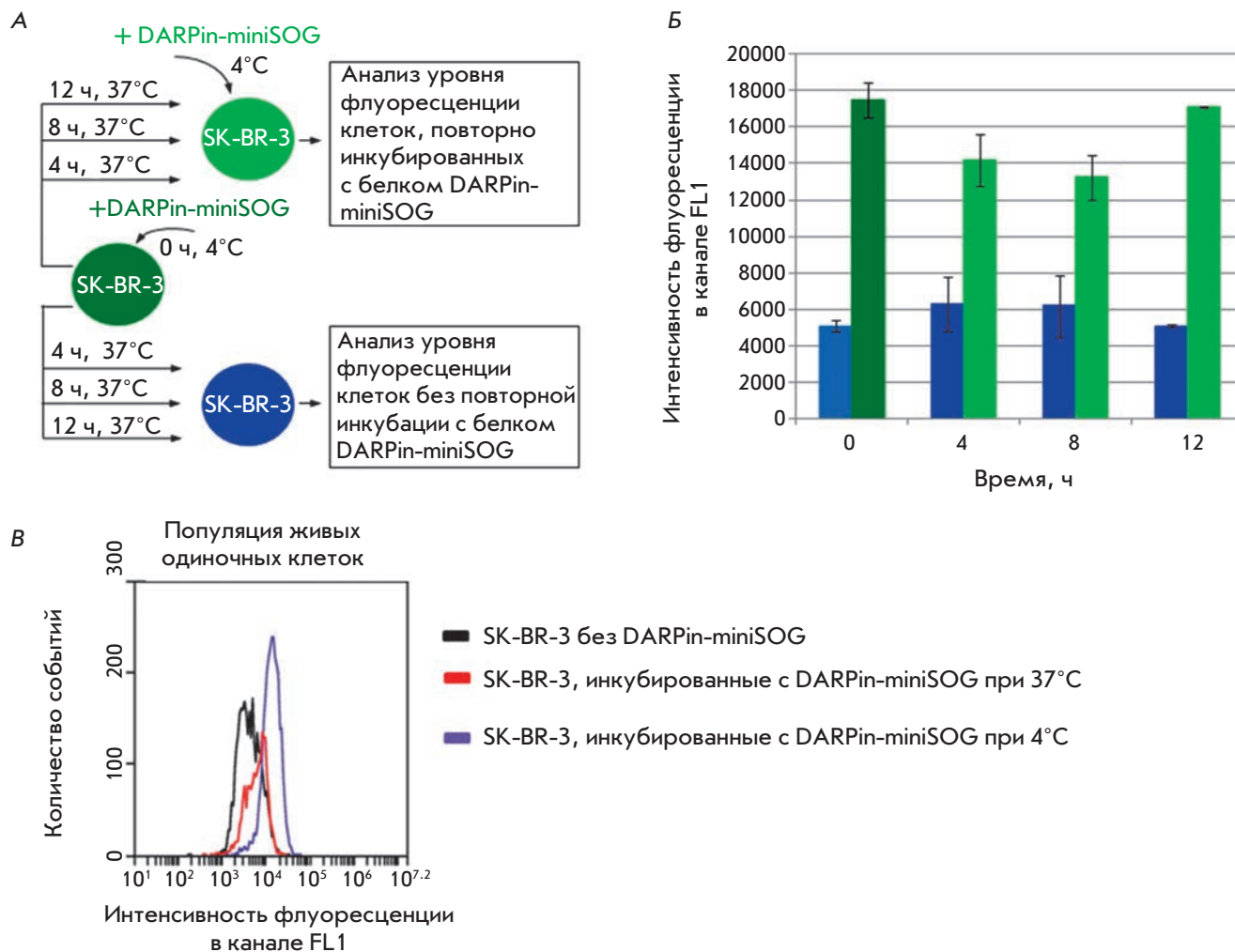


Рис. 2. Взаимодействие белка DARPin-miniSOG с рецептором HER2 клеток SK-BR-3. **А** – схема эксперимента. **Б** – гистограмма изменения во времени уровня флуоресценции HER2-положительных клеток SK-BR-3, обработанных адресным белком DARPin-miniSOG. Голубой столбец на гистограмме показывает уровень исходной аутофлуоресценции клеток SK-BR-3, темно-зеленый столбец – уровень флуоресценции клеток SK-BR-3, однократно обработанных белком DARPin-miniSOG при 4°C. Синие столбцы соответствуют уровню флуоресценции, сохранившемуся после обработки клеток белком DARPin-miniSOG при 4°C и последующей инкубации при 37°C в течение 4, 8 и 12 ч. Светло-зеленые столбцы соответствуют уровню флуоресценции клеток, обработанных белком DARPin-miniSOG при 4°C, проинкубированных при 37°C в течение 4, 8 и 12 ч и обработанных белком DARPin-miniSOG повторно при 4°C. Планки погрешностей на гистограмме показывают стандартное отклонение, посчитанное по результатам двух независимых экспериментов. **В** – изменение уровня флуоресценции клеток SK-BR-3 в зависимости от условий инкубации с белком DARPin-miniSOG

Для установления механизмов воздействия адресного фототоксина DARPin-miniSOG на опухолевую клетку необходимо было выяснить, что происходит с образовавшимся комплексом рецептор–белок после специфичного связывания DARPin-miniSOG с HER2-положительными клетками. Происходит ли интернализация HER2, и если да, то какова дальнейшая судьба HER2 после интернализации – рециркуляция или деградация в поздних лизосомах?

Способность рецептора HER2 к интернализации в настоящее время активно изучается. Процесс лиганд-индуцированной интернализации других рецепторов семейства эпидермального фактора роста (EGFR/HER1 и HER3) описан весьма детально: рецептор, активированный лигандом, подвергается быстрому рецептор-опосредованному эндоцитозу [13]. После интернализации возможна сортировка комплекса рецептор–лиганд в ранней эндосоме (бы-

страя рециркуляция) или в мультивезикулярных тельцах (медленный возврат). И в том и в другом случае рецептор снова экспонируется на мембране. Но возможен и третий путь: деградация комплекса рецептор–лиганд в лизосоме. Судьба рецептора определяется чувствительностью комплекса рецептор–лиганд к кислотной деградации на пути от эндосом к лизосомам. Менее стойкие комплексы диссоциируют раньше, и рецептор подвергается рециркуляции. Более устойчивые комплексы диссоциируют позже, и рецепторы в комплексе с лигандом деградируют в лизосомах [14].

В современной научной литературе существуют две диаметрально противоположных точки зрения на интернализацию рецептора HER2. В то время как одни исследования указывают на то, что HER2 не способен к эндоцитозу [15, 16], в других показано, что HER2 интернализуется, но снова экспонируется на клеточной мембране в результате быстрой эффективной рециркуляции из ранней эндосомы [17–19].

Хорошо известно, что HER2, в отличие от других членов семейства, не имеет природных лигандов, а его внутриклеточный домен лишен сигнала интернализации [20]. Следовательно, изучать эндоцитоз гомодимеров, индуцированный лиганд–рецепторным взаимодействием, невозможно. Есть данные, свидетельствующие о том, что экспрессия HER2 подавляет формирование клатриновых ямок на клеточной поверхности [16, 21]. Приведены доказательства того, что HER2 способен ингибировать лиганд–активированную интернализацию других рецепторов семейства эпидермального фактора роста при образовании гетеродимеров с ними [22]. На сегодняшний день доказано, что гуманизированное моноклональное антитело Трастузумаб (Herceptin), широко применяемое в терапии HER2-положительных опухолей молочной железы, само по себе не способно приводить к интернализации HER2 [23], как предполагалось первоначально. Однако сочетанное использование Трастузумаба с другим, неконкурентным, антителом – Пертузумабом (Perjeta) или с антителом L26, которое, как и Пертузумаб, препятствует образованию гетеродимеров рецептора HER2 с другими членами семейства эпидермального фактора роста, приводит к эффективной интернализации HER2 и его деградации [24–26].

Есть данные, согласно которым не только полно-размерные антитела, но и мини-антитела формата scFv, специфичные к внеклеточному домену HER2, вызывают интернализацию рецептора HER2. Так, в работе [27] показано, что инкубация HER2-положительных клеток BT-474 с комплексом 4D5scFv–дибарназа, представляющим собой одноцепочечный переменный фрагмент мини-

антитела 4D5 к рецептору HER2/neu, соединенный с двумя молекулами барназы – цитотоксической РНКазы из *Bacillus amyloliquefaciens*, при 37°C приводит к полному удалению рецептора с поверхности клеток. При этом рецептор обнаруживается в эндосомах и мультивезикулярных тельцах [27]. Также возможность интернализации рецептора HER2 показана при его взаимодействии с гибридным белком DARPIn-mCherry, узнающим внеклеточный домен HER2 [28].

В настоящей работе изучена интернализация рецептора HER2 при его связывании с белком DARPIn-miniSOG.

Схема эксперимента представлена на рис. 2А. При этом сначала определяли уровень флуоресценции клеток, окрашенных белком DARPIn-miniSOG при 4°C (условия, в которых интернализация не идет) (рис. 2Б, темно-зеленый столбец, время 0 ч), в сравнении с аутофлуоресценцией (рис. 2Б, голубой столбец, время 0 ч). Затем определяли уровень флуоресценции этих однократно окрашенных клеток через 4, 8 и 12 ч после инкубации при 37°C в CO₂-инкубаторе (условия, в которых идет интернализация) без повторного окрашивания (рис. 2Б, синие столбцы, время 4, 8 и 12 ч соответственно) и после их повторной окраски на холоду белком DARPIn-miniSOG (рис. 2Б, светло-зеленые столбцы, время 4, 8 и 12 ч соответственно). Отметим, что белок DARPIn-miniSOG для этих опытов брали в количестве, избыточном по отношению к количеству рецептора на клетках.

Об интернализации комплекса HER2/DARPIn-miniSOG свидетельствует резкое падение интенсивности флуоресценции клеток SK-BR-3, инкубированных с белком DARPIn-miniSOG при 37°C, по сравнению с клетками, инкубированными с белком DARPIn-miniSOG при 4°C: в течение 10 мин инкубации при 37°C происходит падение средней интенсивности флуоресценции более чем в 2 раза (рис. 2В). При этом показано, что средняя интенсивность флуоресценции клеток SK-BR-3, предварительно окрашенных белком DARPIn-miniSOG при 4°C, после их инкубации при 37°C (в условиях интернализации) превышает исходный уровень средней интенсивности аутофлуоресценции в 1.4 раза через 4 ч, в 1.3 раза через 8 ч и снижается почти до исходного уровня аутофлуоресценции через 12 ч (рис. 2Б, синие столбики).

Способность клеток SK-BR-3 повторно окрашиваться белком DARPIn-miniSOG при 4°C по сравнению с контрольными клетками SK-BR-3, однократно обработанными белком DARPIn-miniSOG при 4°C (темно-зеленый столбик), через 4 ч снижается в 1.2 раза, а через 8 ч – в 1.4 раза (рис. 2Б, светло-зеленые столбики). Через 12 ч способность клеток SK-BR-3

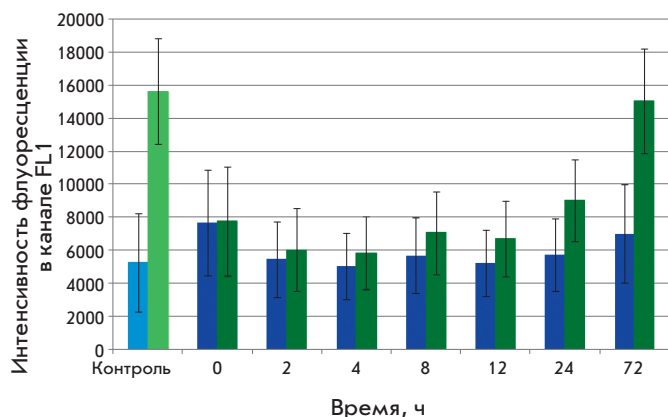


Рис. 3. Динамика окраски белком DARPIn-miniSOG клеток SK-BR-3, обработанных папаином. В качестве контроля взяты клетки SK-BR-3, необработанные папаином: голубой столбец – уровень исходной аутофлуоресценции клеток SK-BR-3, светло-зеленый столбец – уровень флуоресценции клеток SK-BR-3, обработанных белком DARPIn-miniSOG при 4°C. Синие столбцы каждой временной точки соответствуют уровню флуоресценции клеток SK-BR-3, обработанных папаином. Темно-зеленые столбцы соответствуют уровню флуоресценции клеток SK-BR-3, обработанных папаином в нулевой момент времени и окрашенных белком DARPIn-miniSOG при 4°C через 2, 4, 8, 12, 24 и 72 ч. Планки погрешностей на гистограмме показывают стандартное отклонение

повторно окрашиваться белком DARPIn-miniSOG при 4°C возвращается к первоначальному уровню.

Способность клеток повторно окрашиваться белком DARPIn-miniSOG после инкубации при 37°C может обуславливаться распадом комплекса HER2/DARPIn-miniSOG и возвратом рецептора HER2 на мембрану, а также быстрым биосинтезом новых молекул рецептора.

Для изучения вклада биосинтеза новых молекул рецептора была изучена динамика окрашивания белком DARPIn-miniSOG клеток SK-BR-3, с поверхности которых с помощью папаина удален внеклеточный домен HER2. Через 12 и 24 ч после удаления внеклеточного домена HER2 уровень флуоресценции клеток SK-BR-3, окрашенных DARPIn-miniSOG, со-

ставлял всего 43 и 57% от исходного соответственно и достигал первоначального уровня лишь через 72 ч (рис. 3). Таким образом, показано, что за 12 ч клетки SK-BR-3, лишённые рецептора HER2, не успевают полностью восстановить способность окрашиваться белком DARPIn-miniSOG, т.е. наработать рецептор HER2 в количестве, соответствующем клеткам SK-BR-3, не обработанным папаином (рис. 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень рецептора HER2 на поверхности клеток SK-BR-3 аденокарциномы молочной железы не является неизменным: при связывании белка DARPIn-miniSOG с рецептором HER2 происходит интернализация комплекса HER2/DARPIn-miniSOG, число молекул рецептора на поверхности клетки при этом уменьшается и соответственно уменьшается флуоресценция клеток, повторно окрашенных белком DARPIn-miniSOG (рис. 2). Через ~12 ч среднее значение интенсивности флуоресценции повторно окрашенных клеток достигает исходного значения. Таким образом, на основании проведенных экспериментов и учитывая динамику биосинтеза HER2, следует сделать вывод, что после интернализации комплекса HER2/DARPIn-miniSOG происходит его распад и медленный возврат рецептора HER2 на клеточную мембрану. При этом поступление вновь синтезированных молекул рецептора HER2 на мембрану клеток невелико и не вносит большого вклада в среднее значение интенсивности флуоресценции окрашенных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе выявлены закономерности специфического взаимодействия белка DARPIn-miniSOG с рецептором HER2, получены данные, свидетельствующие об интернализации рецептора HER2 в комплексе с DARPIn-miniSOG и последующем возврате рецептора на клеточную мембрану. Полученные данные важны для дальнейшей разработки методов терапии HER2-положительных опухолей на основе нового фотоситотоксического белка DARPIn-miniSOG. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-24-00106).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. // Acta Naturae. 2009. Т. 1. № 1. С. 32–50.
2. Deyev S.M., Lebedenko E.N. // BioEssays. 2008. V. 30. № 9. P. 904–918.
3. Boersma Y.L., Plückerthun A. // Curr. Opin. Biotechnol. 2011. V. 22. № 6. P. 849–857.
4. Löfblom J., Frejd F.Y., Ståhl S. // Curr. Opin. Biotechnol. 2011. V. 22. № 6. P. 843–848.
5. Деев С.М., Лебеденко Е.Н., Петровская Л.Е., Долгих Д.А., Габибов А.Г., Кирпичников М.П. // Успехи химии. 2015. Т. 84. Вып. 1. С. 1–26. (Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. // Rus. Chem. Rev. 2015. V. 84. № 1. P. 1–26.)

6. Steiner D., Forrer P., Plückthun A. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. № 5. P. 1211–1227.
7. Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L. // *Science.* 1987. V. 235. № 4785. P. 177–182.
8. Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E., Levin W.J., Stuart S.G., Udove J., Ullrich A. // *Science.* 1989. V. 244. № 4905. P. 707–712.
9. Holbro T., Hynes N.E. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004. V. 44. P. 195–217.
10. Shu X., Lev-Ram V., Deerinck T.J., Qi Y., Ramko E.B., Davidson M.W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien R.Y. // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. № 4. e1001041.
11. Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. // *Theranostics.* 2013. V. 3. № 11. P. 831–840.
12. Jost C., Schilling J., Tamaskovic R., Schwill M., Honegger A., Plückthun A. // *Structure.* 2013. V. 21. № 11. P. 1979–1991.
13. Sorkin A., Goh L.K. // *Exp. Cell Res.* 2009. V. 315. № 4. P. 683–696.
14. Sorkin A., Waters C.M. // *BioEssays.* 1993. V. 15. № 6. P. 375–382.
15. Hommelgaard A.M., Lerdrup M., van Deurs B. // *Mol. Biol. Cell.* 2004. V. 15. № 4. P. 1557–1567.
16. Haslekas C., Breen K., Pedersen K.W., Johannessen L.E., Stang E., Madshus I.H. // *Mol. Biol. Cell.* 2005. V. 16. № 12. P. 5832–5842.
17. Harari D., Yarden Y. // *Oncogene.* 2000. V. 19. № 53. P. 6102–6114.
18. Hendriks B.S., Opresko L.K., Wiley H.S., Lauffenburger D. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 5. P. 1130–1137.
19. Austin C.D., de Maziere A.M., Pisacane P.I., van Dijk S.M., Eigenbrot C., Sliwkowski M.X., Klumperman J., Scheller R.H. // *Mol. Biol. Cell.* 2004. V. 15. № 12. P. 5268–5282.
20. Sorkin A., Di Fiore P.P., Carpenter G. // *Oncogene.* 1993. V. 8. № 11. P. 3021–3028.
21. Cortese K., Howes M.T., Lundmark R., Tagliatti E., Bagnato P., Petrelli A., Bono M., McMahon H.T., Parton R.G., Tacchetti C. // *Mol. Biol. Cell.* 2013. V. 24. № 2. P. 129–144.
22. Wang Z., Zhang L., Yeung T.K., Chen X. // *Mol. Biol. Cell.* 1999. V. 10. № 5. P. 1621–1636.
23. Longva K.E., Pedersen N.M., Haslekas C., Stang E., Madshus I.H. // *Int. J. Cancer.* 2005. V. 116. № 3. P. 359–367.
24. Ben-Kasus T., Schechter B., Lavi S., Yarden Y., Sela M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 9. P. 3294–3299.
25. Nahta R., Hung M.C., Esteva F.J. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 7. P. 2343–2346.
26. Friedman L.M., Rinon A., Schechter B., Lyass L., Lavi S., Bacus S.S., Sela M., Yarden Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 6. P. 1915–1920.
27. Ivanova J.L., Edelweiss E.F., Leonova O.G., Balandin T.G., Popenko V.I., Deyev S.M. // *Biochimie.* 2012. V. 94. № 8. P. 1833–1836.
28. Миронова К.Е., Черных О.Н., Рябова А.В., Стрёмовский О.А., Прошкина Г.М., Деев С.М. // *Биохимия.* 2014. Т. 79. № 12. С. 1698–1704.