

УДК 616.981.48:575

Оптимизация схемы выделения и рефолдинга внеклеточного домена HER2, экспрессированного в клетках *Escherichia coli*

В. В. Долгих, И. В. Сендерский, Г. В. Тец, В. В. Тец*

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Министерства здравоохранения РФ, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8

*E-mail: vtetzv@yahoo.com

Поступила в редакцию 07.06.2013

После доработки 10.02.2014

РЕФЕРАТ Рецептор-2 эпидермального ростового фактора человека (HER2/neu, c-erbB2) является протоонкогенным белком размером 185 кДа, характеризующимся гиперэкспрессией при ряде онкологических заболеваний, включающих 30% случаев рака молочной железы. Иммунодиагностика HER2-статуса опухоли имеет большое значение для успешной борьбы с заболеванием, в связи с чем получение значительных количеств экстраклеточного домена (ECD) HER2 остается весьма актуальной задачей. Нарботка ECD HER2 в *Escherichia coli* имеет ряд преимуществ по сравнению с использованием эукариотических систем экспрессии, однако большая часть рекомбинантного продукта накапливается в бактериях в виде нерастворимых белковых включений. В данной работе мы осуществили эффективную наработку ECD HER2 в *E. coli* в виде нерастворимых белковых включений и предложили простую, эффективную и быстровыполнимую схему солиubilизации, рефолдинга и выделения белка в растворимой форме.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бактериальная экспрессия, рефолдинг, рецептор эпидермального фактора роста, экстраклеточный домен.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ECD HER2 – экстраклеточный домен рецептора-2 эпидермального ростового фактора человека; ДСН-ПААГЭ – электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии анионного детергента додецилсульфата натрия.

ВВЕДЕНИЕ

Рецептор-2 эпидермального ростового фактора человека (HER2/neu, c-erbB2) представляет собой протоонкогенный белок размером 185 кДа, состоящий из трех основных доменов – экстраклеточного, трансмембранного и внутриклеточного, обладающего тирозин-киназной активностью [1]. В нормальных клетках белок образует гетеродимеры с другими представителями семейства эпидермальных ростовых факторов человека и участвует в регуляции процессов клеточной пролиферации и дифференцировки [2]. Значительная часть онкологических заболеваний, включающих 30% случаев рака молочной железы, а также некоторые злокачественные опухоли яичника, желудка и других органов, сопровождается гиперэкспрессией белка HER2. При этом высокий уровень экспрессии белка характерен для рецидивных форм рака с плохим прогнозом [2]. Для лечения HER2-позитивных заболеваний достаточно эффективной является терапия на основе таргетного пре-

парата герцептин (Трастузумаб). В последнее время были разработаны новые таргетные препараты: пертузумаб, ингибирующий процесс димеризации HER2 с другими рецепторами, а также иммунотоксин трастузумаб-эмантин, представляющий собой конъюгат герцептина и цитотоксичного агента мертанзина. Таким образом, иммунодиагностика HER2-статуса опухоли имеет большое значение для успешной борьбы с заболеванием. Наряду с иммунохимическими и иммуногистохимическими методами анализа материала, полученного с помощью биопсии, в последнее время все больше внимания уделяется выявлению в сыворотке больных пациентов белка HER2. В крови циркулирует N-концевая часть молекулы, представленная экстраклеточным доменом (ECD) белка [3], к которой у изученных пациентов вырабатываются специфичные антитела [4]. В ряде работ была показана корреляция между тяжестью заболевания и уровнем ECD HER2 в сыворотке пациентов [5]. Однако позднее были получены результаты, свиде-

тельствующие о том, что эта зависимость не столь очевидна и ее подтверждение требует дальнейшего анализа [6, 7].

Приведенные выше данные свидетельствуют об актуальности получения значительных количеств ECD HER2 в очищенном виде, который необходим для наработки диагностических антител и анализа титра антител в сыворотке пациентов, а также для создания таргетных препаратов нового поколения [8].

Наработка ECD HER2 в бактериях *Escherichia coli* имеет ряд преимуществ по сравнению с использованием эукариотических систем экспрессии. В первую очередь это более значительный выход рекомбинантного продукта и его более низкая стоимость [9]. Другой вариант получения сравнительно недорогого белка связан с экспрессией ECD HER2 в дрожжевых грибах *Pichia pastoris* и сопровождается высокой степенью маннозилирования белка, что нехарактерно для нативных молекул, синтезируемых в организме человека [10]. Следует признать, что ECD HER2 имеет семь сайтов N-гликозилирования и экспрессия белка в *E. coli* не позволяет получить белок с соответствующими посттрансляционными модификациями. Однако нарабатываемый в бактериях продукт представляет несомненный интерес для разработки тест-систем и отбора соответствующих антител. Существенным недостатком при экспрессии ECD HER2 в клетках *E. coli* является также накопление рекомбинантного продукта в виде нерастворимых белковых включений.

В частности, гетерологичная экспрессия последовательности, кодирующей ECD HER2 (вместе с сигнальным пептидом) в векторах pGEX-6P-1 и pQE30, позволила получить рекомбинантные белки, слитые соответственно с N-концевыми глутатион-S-трансферазой (GST-ECD HER2) и последовательностью, состоящей из шести остатков гистидина [9]. В обоих случаях почти весь продукт экспрессии накапливался в бактериальных клетках в виде нерастворимых включений. При этом использование авторами разнообразных схем рефолдинга, связанных с изменением pH, температуры, времени инкубации, концентрации мочевины, EDTA (этилендиаминтетрауксусной кислоты), L-аргинина, окисленного и восстановленного глутатиона, незначительно влияло на эффективность рефолдинга GST-ECD HER2. Для различных использованных схем она составила 63–92% от максимально достигнутого значения. Сами авторы отмечают, что из семи проанализированных факторов только pH и время инкубации оказывали влияние на эффективность рефолдинга белка. Это позволило предположить, что накапливающийся в бактериях в виде белковых включений рекомби-

нантный ECD HER2 может быть переведен в растворимое состояние с использованием несложных процедур разведения, концентрирования и диализа.

В предыдущем исследовании мы повторили экспрессию ECD HER2 в бактериях *E. coli* с использованием вектора pRSET (Life Technologies) под контролем высокоактивного промотора бактериофага T7 [11]. В использованной конструкции был удален N-концевой сигнальный пептид, ответственный за секрецию HER2 и отрезаемый в ходе его транслокации в просвет эндоплазматического ретикула. При этом конструкция вектора подразумевает добавление к рекомбинантному белку N-концевого пептида с полигистидиновой последовательностью. В данном исследовании полученный в виде нерастворимых белковых включений рекомбинантный белок был использован для демонстрации возможности его солиubilизации и рефолдинга с использованием максимально простой, быстровыполнимой схемы, не требующей наличия сложного набора реактивов. В работе также показано важное значение SH-реагентов для эффективного растворения белковых включений, образуемых ECD HER2.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Процедуры клонирования последовательности, кодирующей ECD HER2 человека в векторе pRSET, эффективной наработки рекомбинантного белка в штамме C41 *E. coli*, выделения, отмывки и хранения белковых включений подробно описаны ранее [11].

Подходы, использованные для солиubilизации и восстановления нативной конформации рекомбинантного белка, приведены при описании результатов исследования.

Очистку белка методом металлохелатной хроматографии осуществляли на колонке со смолой HIS-Select® (Sigma-Aldrich), уравновешенной раствором, содержащим 50 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 0.3 М NaCl и 10 мМ имидазол. Для этого раствор белка, дополнительно содержащего те же компоненты, пропускали через колонку, связавшийся материал промывали уравновешивающим буфером и элюировали в присутствии 0.3 М имидазола. Полученные фракции объединяли, концентрировали с использованием центрифужных концентраторов Centricon (Millipore), пропускающих молекулы размером до 30 кДа, и хранили при –20°C в присутствии 50% глицерина. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Брэдфорд [12].

Электрофорез белков в 12% полиакриламидном геле в присутствии анионного детергента додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГЭ) осуществляли с использованием камеры Mini-PROTEAN® (Bio-Rad). Для проведения иммуноблотинга белки

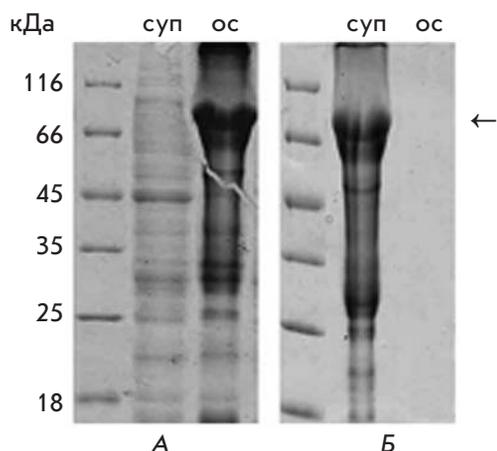


Рис. 1. Анализ осадков (ос) и супернатантов (суп) после экстракции рекомбинантного ECD HER2 из белковых включений. Использовали следующие растворы: А – 50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 8 М мочевины; Б – 50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 8 М мочевины, 1% 2-меркаптоэтанол. Белки разделяли методом ДСН-ПААГЭ в 12% геле и окрашивали красителем Кумасси R-250. Полосы, соответствующие изучаемому белку, указаны стрелкой

после ДСН-ПААГЭ переносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью вкладыша для блоттинга Mini-Trans-Blot® согласно инструкции того же производителя. Мембраны блокировали 1 ч в присутствии ТТБС (50 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 150 мМ NaCl, 0.05% Твин-20), 1% БСА и инкубировали с разбавленным тем же раствором 1 : 3000 анти-polyHis-антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich) в течение ночи при 4°C. После отмывки в ТТБС и затем в ТБС (ТТБС без добавления Твин-20) мембрану инкубировали в свежеприготовленном растворе для проявления пероксидазной реакции, содержащем ТБС, 15% метанол, 0.05% 4-хлоро-1-нафтол (Sigma-Aldrich), 0.02% H₂O₂.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования мы поработали в бактериях и выделили рекомбинантный ECD HER2 в виде нерастворимых белковых включений по ранее описанному методу [11]. Далее для сольubilизации белковых включений была повторена схема, использованная для GST-ECD HER2 [9], с точным соблюдением описанной процедуры. Белковые включения ресуспендировали в растворе, содержащем 10 мМ Трис-НСl, 0.1 М NaH₂PO₄, 8 М мочевины, 5 мМ дитиотреитол (рН 8.0), и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. После центрифугиро-

вания сольubilизированного материала при 14000 g в течение 10 мин осадки ресуспендировали в том же растворе до объема супернатанта и в полученных пробах сравнивали содержание рекомбинантного белка с помощью ДСН-ПААГЭ. Эксперимент показал, что после использования данной схемы сольubilизации примерно половина рекомбинантного белка остается в нерастворимом состоянии (не показано). Более того, данный результат наблюдался только при использовании свежеприготовленного раствора. После его хранения около 2 месяцев при 4°C эффективность сольubilизации белка значительно снижалась. Мы предположили, что основная причина снижения сольubilизирующих свойств раствора может быть связана с окислением дитиотреитола – относительно нестабильного реагента, содержащего восстановленные SH-группы.

Для подтверждения важной роли SH-реагентов в процессе сольubilизации белка было проанализировано, насколько хорошо рекомбинантный продукт растворяется в присутствии 8 М мочевины без добавления SH-содержащих агентов или в присутствии 8 М мочевины с добавлением 1% 2-меркаптоэтанол. С этой целью белковые включения сольubilизировали в растворе, содержащем 50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), а также указанные компоненты, и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Как и в предыдущем эксперименте, сольubilизированный материал отделяли центрифугированием, и осадки ресуспендировали в тех же растворах до объема супернатанта для сравнения содержания рекомбинантного белка в полученных пробах. Как показал проведенный эксперимент, не растворимый в бактериях ECD HER2 практически не растворялся в присутствии 8 М мочевины без добавления 2-меркаптоэтанол (*рис. 1А*). При добавлении в сольubilизирующий раствор 2-меркаптоэтанол наблюдался полный переход рекомбинантного белка в растворимое состояние (*рис. 1Б*). Полученный результат свидетельствовал о важной роли SH-содержащих соединений в сольubilизации экспрессированного в бактериях ECD HER2 и позволил заключить, что увеличение содержания дитиотреитола или 2-меркаптоэтанол в растворе для сольubilизации белковых включений может повысить выход растворимой формы ECD HER2. Количественное определение содержания белка в супернатанте показало, что использованный подход позволяет получить около 70 мг белка, экстрагированного из белковых включений, выделенных из 1 л бактериальной культуры.

Экстрагированный в присутствии 8 М мочевины и 1% 2-меркаптоэтанол материал был использован для оценки возможности использования макси-

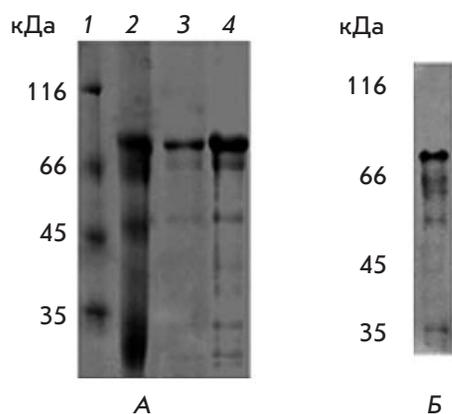


Рис. 2. Анализ растворимой формы ECD HER2 с помощью ДСН-ПААГЭ и иммуноблотинга. А – белок, экстрагированный в присутствии 8 М мочевины и 1% 2-меркаптоэтанола (дорожка 2), был разведен в 250 раз в буфере для уравнивания смолы HIS-Select® и очищен с помощью металлохелатной хроматографии (на дорожки 3 и 4 нанесено разное количество белка). Белки разделяли методом ДСН-ПААГЭ в 12% геле и окрашивали Кумасси R-250. На дорожку 1 нанесены маркеры молекулярного веса. Б – анализ с помощью иммуноблотинга белка, экстрагированного из белковых включений, показал присутствие в препарате ECD HER2 минорных полос меньшего размера, узнаваемых антителами к полигистидиновой последовательности. Это свидетельствует о незначительном гидролизе рекомбинантного белка

мально простой схемы рефолдинга при получении рекомбинантного ECD HER2 в растворимой форме. Для этого полученный в предыдущем эксперименте супернатант, содержащий солюбилизованный белок в концентрации 18 мг/мл, разводили при интенсивном перемешивании в 250 раз в растворе, используемом для уравнивания Ni-содержащей смолы HIS-Select® (Sigma-Aldrich) при проведении металлохелатной хроматографии (50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 0.3 М NaCl и 10 мМ имидазол). Разведенный в объеме 50 мл белок сразу пропускали через колонку с 400 мкл смолы, колонку тщательно промывали уравнивающим буфером, и рекомбинантный ECD HER2 элюировали в присутствии 0.3 М имидазола. Измерение содержания белка в исходном экстракте и полученных фракциях показало, что со смолой связалось и было элюировано 15% белка, пропущенного через колонку (0.54 из 3.6 мг).

Как показал анализ полученных фракций с помощью ДСН-ПААГЭ, использованная схема по-

зволяет получить растворимый рекомбинантный белок в достаточно чистом состоянии (рис. 2А, дорожки 3 и 4). Балластные белки с молекулярным весом большим, чем вес ECD HER2, практически отсутствовали в полученных фракциях, а несколько минорных компонентов с меньшей массой могли оказаться результатом незначительного гидролиза рекомбинантного белка в ходе выделения, так как некоторые из них реагировали с антителами к полигистидиновой последовательности (рис. 2Б). Поскольку белок, очищенный с помощью металлохелатной хроматографии, чаще всего содержит дополнительные примеси, оптимизация условий хроматографии, а также использование дополнительных методов очистки в будущем могут быть полезными для получения препаратов полностью свободных от примесей. ●

Работа поддержана РФФИ
(грант № 12-08-01086-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coussens L., Yang-Feng T.L., Liao Y.C., Chen E., Gray A., McGrath J., Seeburg P.H., Libermann T.A., Schlessinger J., Francke U., et al. // *Science*. 1985. V. 230. P. 1132–1139.
2. Polanovski O.L., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *Biochemistry (Moscow)*. 2012. V. 77. P. 227–245.
3. Sandri M.T., Johansson H., Colleoni M., Zorzino L., Passerini R., Orlando L., Viale G. // *Anticancer Res*. 2004. V. 24. P. 1261–1266.
4. Disis M.L., Schiffman K., Guthrie K., Salazar L.G., Knutson K.L., Goodell V., dela Rosa C., Cheever M.A. // *J. Clin. Oncol*. 2004. V. 22. № 10. P. 1916–1925.
5. Pichon M.F., Hacene K., Guepratte S., Neumann R. // *Clin. Lab*. 2004. V. 50. № 3–4. P. 163–170.
6. Leary A.F., Hanna W.M., van de Vijver M.J., Penault-Llorca F., Rüschoff J., Osamura R.Y., Bilous M., Dowsett M. // *J. Clin. Oncol*. 2009. V. 27. № 10. P. 1694–1705.
7. Lennon S., Barton C., Banken L., Gianni L., Marty M., Baselga J., Leyland-Jones B. // *J. Clin. Oncol*. 2009. V. 27. № 10. P. 1685–1693.
8. Belimezi M.M., Papanastassiou D., Merkouri E., Baxevanis C.N., Mamalaki A. // *Cancer Immunol. Immunother*. 2006. V. 55. № 9. P. 1091–1099.
9. Liu X., He Z., Zhou M., Yang F., Lv H., Yu Y., Chen Z. // *Protein Expr. Purif*. 2007. V. 53. № 2. P. 247–254.
10. Dimitriadis A., Gontinou C., Baxevanis C.N., Mamalaki A. // *BMC Cancer*. 2009. V. 9. P. 386.
11. Долгих В.В., Сендерский И.В., Тец Г.В., Тец В.В. // *Уч. зап. ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова*. 2013. Т. 20. № 4. С. 70–73.
12. Bradford M. // *Anal. Biochem*. 1976. V. 72. P. 248–254.