

ОДЕРЖАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ПОХІДНИХ РЕКОМБІНАНТНОГО АНАЛОГА СЕКРЕТОРНОЇ ФОРМИ НВ-EGF ЛЮДИНИ

Н. В. Короткевич

А. Ю. Лабинцев

Д. В. Колибо

С. В. Комісаренко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: gnr.nata@gmail.com

Отримано 21.11.2013

Гепаринзв'язувальний фактор росту, подібний до епідермального ростового фактора — НВ-EGF (Heparin-Binding Epidermal growth factor-like Growth Factor), належить до родини епідермальних ростових факторів і синтезується у вигляді мембранно-заякореного попередника pro-НВ-EGF. Зв'язування секреторної форми фактора sНВ-EGF (від англ.: soluble НВ-EGF) з рецепторами EGFR і HER-4 приводить до утворення відповідних лігандрецепторних комплексів та активації сигнальних шляхів, які відіграють важливу роль у регулюванні проліферації, диференціації та міграції клітин.

Метою роботи було одержання рекомбінантних флуоресцентних похідних на основі повнорозмірної форми sНВ-EGF людини (mCherry-sНВ-EGF) та вкороченої форми sНВ-EGF Δ 84-106 (mCherry-sНВ-EGF Δ 84-106), яка б не містила гепаринзв'язувальної ділянки.

Показано здатність обох флуоресцентних похідних специфічно зв'язуватись із EGFR-рецептором клітин та рецепторопосередковано інтерналізуватись всередину клітини, а також посилювати проліферацію клітин миші лінії 3T3. При цьому відсутність гепаринзв'язувальної ділянки в структурі mCherry-sНВ-EGF 84-106 суттєво не впливала на його здатність зв'язуватись із рецептором, проте знижувала його мітогенну активність майже у два рази. Одержані флуоресцентні похідні sНВ-EGF можуть бути зручним інструментом для дослідження молекулярних механізмів реалізації біологічної активності sНВ-EGF та ролі гепаринзв'язувальної активності у процесах взаємодії sНВ-EGF з рецептором і подальшого внутрішньоклітинного транспортування лігандрецепторного комплексу.

Ключові слова: гепаринзв'язувальний EGF-подібний фактор росту (НВ-EGF), рецептор епідермального фактора росту.

Гепаринзв'язувальний фактор росту, що подібний до епідермального фактора росту — НВ-EGF (від англ.: Heparin-Binding Epidermal growth factor-like Growth Factor) належить до родини епідермальних ростових факторів. НВ-EGF має високу афінність до гепарину та гепарансульфатпротеогліканів (ГСПГ) [1]. НВ-EGF синтезується у вигляді мембранно-заякореного попередника — pro-НВ-EGF, який під дією мембранних металопротейназ може переходити в розчинну форму фактора — sНВ-EGF (від англ.: soluble НВ-EGF). Рецепторами для sНВ-EGF є гомодимери рецепторів родини епідермальних ростових факторів першого (HER-1, EGFR, Human Epidermal Growth Factor Receptor)

і четвертого (HER-4) типу, а також їхні гетеродимери з HER-2 та HER-3. Зв'язування sНВ-EGF з рецептором призводить до утворення лігандрецепторного комплексу sНВ-EGF/EGFR і активації сигнальних шляхів, які відіграють вирішальну роль у регулюванні проліферації, диференціації, міграції та інгібуванні апоптозу клітин, що є вкрай важливим за злоякісних перетворень [2].

Відомо, що утворений після зв'язування sНВ-EGF із рецептором лігандрецепторний комплекс sНВ-EGF/EGFR у подальшому зазнає лізосомальної деградації або «ресайклингу» (receptor recycling), тобто повторної появи рецептора на поверхні плазматичної мембрани [3]. З другого боку, дослідження

останніх років виявили здатність EGF, TGF- α після зв'язування з EGFR стимулювати транслокацію лігандрецепторного комплексу в ядро, де останній за наявності кіназної активності EGFR виконує функції регулятора транскрипції шляхом фосфорилювання низки ядерних протеїнів, що сприяє посиленню проліферативного статусу клітини [4]. Отже, після утворення лігандрецепторного комплексу sHB-EGF/EGFRГ можуть реалізуватись декілька сценаріїв його внутрішньоклітинного транспортування. Так, можлива повна лізосомальна деградація ліганду та рецептора або часткова деградація лише ліганду з наступним «ресайклінгом» рецептора на поверхню клітини. Не менш цікавим є дослідження можливих шляхів транспортування власне лігандрецепторного комплексу до ядра клітини. Наразі немає фактичних відомостей щодо здатності sHB-EGF індукувати ядерну транслокацію EGFR, проте pro-HB-EGF виявляє ядерну локалізацію у клітинах пухлин і тканин, що активно проліферують [5].

Таким чином, створення молекулярних інструментів є важливим для дослідження здатності розчинної форми HB-EGF людини індукувати ядерну транслокацію EGFR та виявлення шляхів транспортування sHB-EGF/EGFR лігандрецепторного комплексу. Оскільки суттєвою відмінністю sHB-EGF від інших ростових факторів є його здатність взаємодіяти із поверхневими ГСПГ, що може впливати на його здатність індукувати ядерну транслокацію EGFR та на внутрішньоклітинне транспортування sHB-EGF/EGFR лігандрецепторного комплексу, для проведення досліджень можна застосувати такий методичний підхід, як створення «вкороченої» форми sHB-EGF, яка була би позбавлена здатності взаємодіяти з гепарином та ГПСГ.

Метою роботи було одержання функціонально активних флуоресцентних похідних на основі повнорозмірної розчинної форми sHB-EGF людини та «вкороченої» sHB-EGF Δ_{84-106} , яка б не містила гепаринзв'язувальної ділянки. Також було проведено дослідження можливості використання їх для вивчення молекулярних механізмів реалізації біологічної активності секреторної форми HB-EGF людини, порівняльного аналізу експресії рецепторів EGFR і HER-4 на поверхні клітин різних типів та походження, а також внутрішньоклітинних шляхів транспортування лігандрецепторного комплексу sHB-EGF/EGFR та участі гепаринзв'язувальної ділянки у цих процесах.

Матеріали і методи

Матеріали. У роботі було використано такі реактиви: культуральне середовище RPMI-1640 з L-глутаміном, фетальна сироватка великої рогатої худоби, пеніцилін, стрептоміцин, амфотерицин В (антимікотик), моноклональні антитіла проти EGFR людини, FITC-кон'юговані вторинні антитіла до Fc-фрагментів атитіл миші, кон'юговані з пероксидазою хрому, вторинні антитіла до Fc-фрагментів атитіл миші (Sigma, США), праймери, імідазол, живильне середовище LB, диметилформамід (DMФА), MgCl₂, Taq-полімераза, вільна від нуклеаз вода, ендонуклеази рестрикції BamHI, XhoI, EcoRI, PstI, ДНК-лігаза T4, лужна фосфатаза, набір для виділення ДНК, ізопропіл- β -D-тіо-галактопіранозид (IPTG), протеїнові маркери молекулярної маси в діапазоні від 10 до 180 кДа, ДНК-маркери молекулярної маси в діапазоні від 100 до 10000 п. н. (Fermentas, Литва), Ni-NTI-агароза (Qiagen, ФРН), дезоксирибонуклеотидтрифосфати (dNTPs), нітроцелюлоза Hibond C-Extra (Amersham, США), вектор pET-28a(+) (Novagen, ФРН), вектор pmCherry (ClonTech, США), нітроцелюлоза Hibond C-Extra (Amersham, США).

Обладнання. У роботі застосовували таке обладнання: конфокальний мікроскоп Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, ФРН), протоковий цитофлуориметр Coulter Epics XL (Beckman Coulter, США), ламінарні шафи П рівня біобезпеки (ESCO, Сінгапур), термоциклер AB2720 (Applied Biosystems, США), електропоратор Electroporator 2510 (Eppendorf, ФРН), транслюмінатор Vilber Lourmat TFX-20.LM та пристрій для документації гелів Vilber Lourmat DP-001.FDC (Vilber Lourmat, Франція), ультразвуковий дезінтегратор Labsonic M (Sartorius, ФРН), центрифуга MLW T23D (ELMI, ФРН), пристрій для вертикального електрофорезу Mini-Protein II Electrophoretic Cell (Bio-Rad, США), пристрій для горизонтального електрофорезу (Helicon, Росія), електроблотер Hoefer TE77 (Amersham, США).

Штами-продуценти і клітинні лінії. У дослідженнях використано одержаний нами рекомбінантний аналог розчинної форми sHB-EGF людини зі створеного раніше штаму-продуцента *E. coli* [6]. Виділення sHB-EGF та аналітичну експресію протеїнових продуктів проводили як описано у [6]. Клітинні культури ембріональних фібробластів миші 3T3 та епідермоїдної карциноми піхви людини A431 отримали з банку клітинних ліній Інституту експеримен-

тальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

Культивування клітин екаріотів. Клітини культивували за стандартних умов у культуральному середовищі RPMI-1640 з додаванням 5–10% -ї сироватки ембріонів телят за 5% концентрації CO₂.

Створення генетичних конструкцій pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF та pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} на основі експресійного вектора та отримання клонів-продуцентів відповідних флуоресцентних похідних. Для створення вищезазначених генетичних конструкцій як джерело нуклеотидної послідовності, яка кодує мономерний червоний флуоресцентний протеїн mCherry, було обрано плазмідний вектор *pmCherry*. Як джерело нуклеотидної послідовності повнорозмірної (*sHB-EGF*) та вкороченої (*sHB-EGF Δ_{84-106}*) форми sHB-EGF людини обрали раніше одержану нами генетичну конструкцію *pUC-19-sHB-EGF* [7]. Напрацювання нуклеотидних послідовностей, які кодують флуоресцентний протеїн mCherry, повнорозмірну (*sHB-EGF*) та вкорочену (*sHB-EGF Δ_{84-106}*) форми sHB-EGF людини проводили за допомогою ПЛР з використанням специфічних пар праймерів (таблиця). Одержані в результаті проведення ПЛР нуклеотидні послідовності *sHB-EGF* та *sHB-EGF Δ_{84-106}* об'єднали з нуклеотидною послідовністю *mCherry* через сайт рестрикції EcoRI для *sHB-EGF* та PstI для *sHB-EGF Δ_{84-106}* . Для одержання об'єднаних нуклеотидних послідовностей *mCherry-sHB-EGF* та *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* ПЛР проводили із праймерами *Sence mCherry* та *Antisence sHB-EGF*.

Нуклеотидні послідовності *mCherry-sHB-EGF* та *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* об'єднували з нуклеотидною послідовністю експресійного вектора *pET-28a(+)*, обробляючи ендонуклеазами рестрикції BamHI та XhoI з подальшим лігуванням. Під час проведення вищезазначених маніпуляцій з ДНК дотримувались рекомендацій виробника ен-

зимів. За трансформації клітин *E. coli* штаму *DH10B* одержаними генетичними конструкціями *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF* та *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* застосовували метод електропорації з наступним висіванням на тверде живильне середовище LB (триптон — 10 г/л, дріжджового екстракту — 5 г/л, NaCl — 10 г/л) з 15 г/л агару, яке містило 0,005% канаміцину, що слугував селективним агентом [8]. Колонії клітин перевіряли на наявність нуклеотидних послідовностей *mCherry-sHB-EGF* та *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* у складі вектора за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів, що фланкують ген *mCherry* на 5'-кінці та ген *sHB-EGF/sHB-EGF Δ_{84-106}* — на 3'-кінці. Результатом проведення ПЛР був продукт, який мав у своєму складі нуклеотидні послідовності обох генів. Колонії, що містили вектор *pET-28a(+)* зі вставками нуклеотидних послідовностей *mCherry-sHB-EGF* та *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* , нарощували у рідкому живильному середовищі LB з додаванням селективного агента і застосовували у подальшому для напрацювання отриманих генетичних конструкцій. Для одержання клонів-продуцентів протеїнових продуктів рекомбінантних флуоресцентних похідних sHB-EGF та sHB-EGF Δ_{84-106} проводили електропорацію експресійного штаму *E. coli Rosetta DE3* генетичними конструкціями *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF* та *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* .

Аналітична експресія протеїнових продуктів флуоресцентних похідних *mCherry-sHB-EGF* та *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* . Клітини клонів-продуцентів *E. coli Rosetta DE3* висівали у рідке живильне середовище LB з додаванням 2% глюкози та інкубували за 37 °C в умовах інтенсивної аерації до досягнення культурою оптичної густини 0,5–0,7 за OD₆₀₀. Для індукції експресії рекомбінантних протеїнів додавали ізопропіл- β -D-тіо-галактопіранозид (IPTG) у концентрації 1мМ. Індукцію експресії проводили протя-

Одержання нуклеотидних послідовностей, які кодують флуоресцентний протеїн mCherry, повнорозмірну (sHB-EGF) та вкорочену (sHB-EGF Δ_{84-106}) форми sHB-EGF людини за допомогою ПЛР з використанням специфічних пар праймерів

<i>Sence sHB-EGF</i>	5'– <u>GGATCCATGGACTTGCAAGAGGCAGATC</u> –3'
<i>Sence sHB-EGF Δ_{84-106}</i>	5'– <u>CTGCAGTTCTCTCGGCACTGGT</u> –3'
<i>Antisence sHB-EGF</i>	5'– <u>CTCGAGTCAGAGGCTCAGCCCATG</u> –3'
<i>Sence mCherry</i>	5'– <u>GAAGGATCCACCATGGTGAGCAAGGG</u> –3'
<i>Antisence mCherry</i>	5'– <u>CCAGACGTCTTTGTACAGCTCGTCCATGCC</u> –3'

Примітка: * — підкреслено сайти щеплення ендонуклеаз рестрикції.

гом 3 год при 30 °С. Для проведення аналізу експресії протеїнів готували розчинну й нерозчинну фракції з подальшим електрофорезом у ПААГ. Після напрацювання 2 мл клітинної біомаси осаджували центрифугуванням при 10 000 g. Осад ресуспендували у забуференому фосфатному розчині (ЗФР), концентруючи його в 20 разів, і обробляли ультразвуковим дезінтегратором. Залишки клітин відокремлювали центрифугуванням при 10 000 g. Супернатант містив розчинну фракцію протеїнів *E. coli*, зокрема й цільового протеїну, а осад — нерозчинну. Клітинний осад промивали 1% Triton-X100 та ресуспендували у ЗФР. Аналіз протеїнових фракцій здійснювали за допомогою електрофорезу в 10% ДСН-ПААГ з використанням трис-НСІ буферної системи та додаванням трицину [9]. Застосовували маркери молекулярної маси в діапазоні від 10 до 180 кДа. Проби для електрофорезу готували з додаванням буфера для зразків (40 мг ДСН, 0,48 г сечовини, 50 мкл β-меркаптоетанолу, 1–2 мкл бромфенолового синього на 1 мл буферного розчину), які попередньо прогрівали за температури 70–75 °С протягом 20–30 хв.

Виділення рекомбінантних протеїнів sHB-EGF, mCherry-sHB-EGF і mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} та їх очищення. Нарощення клітинної біомаси та індукцію експресії проводили за описаною вище методикою. Після цього клітинну біомасу осаджували центрифугуванням при 10 000 g, осад ресуспендували в 5 мл буферного розчину, що містив 0,3 М NaCl, 20 мМ Tris-НСІ, 1 мМ DTT та 6 М сечовини, рН 8,0. Отриману клітинну біомасу обробляли ультразвуковим дезінтегратором. Залишки клітин відокремлювали центрифугуванням при 13 000 об/хв протягом 25 хв. Супернатант наносили на попередньо зрівноважену колонку з Ni-NTI-агарозою. Для виконання процедури рефолдингу колонку із сорбованим протеїном промивали буферним розчином того самого складу, але з градієнтом сечовини (8, 6, 4, 2 та 1 М), додаючи 10 мМ імідазолу. Елюцію протеїну проводили 400 мМ імідазолом. З метою створення умов для формування дисульфідних зв'язків до елюйованого протеїну додавали відновлений та окиснений глутатіон у концентрації 6 мМ і 1,2 мМ відповідно. Для подальшого використання протеїн діалізували проти ЗФР (0,8% NaCl, 0,25% KCl, 0,144% Na₂HPO₄ та 0,024% KH₂PO₄, рН 7,2). Аналіз протеїнових фракцій у 10% ДСН-ПААГ здійснювали за описаною вище методикою.

Одержання імунної сироватки мишей проти sHB-EGF людини. Імунізацію мишей лінії Balb/c проводили одержаним раніше рекомбінантним аналогом sHB-EGF людини з використанням повного і неповного ад'юванту Фрейнда [10].

Вестерн-блот-аналіз. Перенесення протеїнів із ПААГ на нітроцелюлозу здійснювали за допомогою електроблотера. Нітроцелюлозну мембрану попередньо витримували у буферному розчині для перенесення (25 мМ Tris, 0,1% ДСН, 20% метилового спирту, 192 мМ гліцину) протягом кількох хвилин. Після перенесення мембрану витримували в 1%-му розчині знежиреного молока в ЗФР за температури 37 °С упродовж 1 год. Після промивання нітроцелюлозну мембрану витримували за тих самих умов у розчині поліклональної сироватки миші в розведенні 1:400 у твін-фосфатному буфері (ТФБ), що являв собою ЗФР з додаванням 0,04% Tween 20. Як вторинні антитіла використовували моноклональні антитіла проти Fc-фрагментів імуноглобулінів миші в розведенні 1:10 000. Проявлення нітроцелюлозної мембрани здійснювали протягом кількох хвилин у розчині для забарвлення, що містив 0,07% діамінобензидинтетрагідрохлориду (ДАБ) та 0,035% H₂O₂ в ЗФР.

Конфокальна мікроскопія. Клітини вирощували до досягнення 70–90% конфлюентного стану, потім пересівали на попередньо знежирені покривні скельця та культивували ще 24 год. Перед забарвленням клітини промивали розчином RPMI-1640. Зразки забарвлювали у RPMI-1640, додаючи відповідні флуоресцентні похідні (mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}) у концентрації 10 мкг/мл або моноклональні антитіла проти рецептора EGFR (1:2 000), попередньо інкубовані з FITC-міченими антитілами кози проти Fc-фрагментів імуноглобулінів миші (1:1 000), після цього інкубували при 37 °С протягом 15 хв. Перед фіксацією зразки двічі промивали ЗФР. Фіксацію зразків проводили 5%-м параформальдегідом у натрійфосфатному буфері. Після цього зразки промивали ЗФР та дистильованою водою. На кожен препарат клітин наносили 25 мкл DABCO-PVA для подальшого збереження та аналізу. До проведення конфокальної мікроскопії зразки зберігали в темряві при 4 °С. Колокалізацію флуоресцентних міток FITC (зелений канал) та mCherry (червоний канал) визначали із застосуванням програмного забезпечення Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>).

МТТ-тест. Клітини ЗТЗ нарощували до конфлуентного стану в 96-лункових планшетах. Перед внесенням рекомбінантних флуоресцентних похідних клітини промивали ЗФР та замінювали на безсироваткове середовище із додаванням рекомбінантних протеїнів у концентрації 1 мкг/мл та культивували за стандартних умов упродовж відповідних проміжків часу. Далі культуральне середовище замінювали на нове, додавали МТТ-реагент [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] у відповідній до рекомендацій виробника концентрації та інкубували протягом 4 год за стандартних умов. Після цього середовище обережно відбирали, додавали буфер для лізису (90% -й диметилсульфоксид — ДМСО, 0,1% додецилсульфат натрію — ДСН) та інкубували ще 5 хв за умов інтенсивного струшування. Оптичне поглинання розчину вимірювали за довжини хвиль 545 (тест) і 630 нм (контроль).

Результати та обговорення

Створення генетичних конструкцій *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF* і *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* та одержання клонів-продуцентів відповідних флуоресцентних похідних. Для створення генетичних конструкцій *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF* та *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* було одержано ПЛР-продукти об'єднаних нуклеотидних послідовностей *mCherry-sHB-EGF* і *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* з використанням відповідних пар праймерів (рис. 1, А). Після цього нуклеотидні послідовності *mCherry-sHB-EGF* і *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* об'єднували за сайтами рестрикції *Bam*HI та *Xho*I із послідовністю експресійного вектора *pET-*

28a(+). У результаті було одержано генетичні конструкції *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF* та *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* для подальшої трансформації клітин *E. coli* штаму DH10B (рис. 1, Б).

Експресія, виділення та очищення рекомбінантних протеїнів *mCherry-sHB-EGF* та *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* . Після трансформування клітин *E. coli* штаму *Rosetta (DE3)* генетичними конструкціями *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF* та *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* серед трансформантів було відібрано окремі клони для проведення експресії відповідних рекомбінантних протеїнів та подальшого вестерн-блот-аналізу з метою підтвердження наявності в лізаті бактеріальних клітин цільового продукту. Результати проведення вестерн-блот-аналізу з використанням поліклональної сироватки мишей, імунізованих *sHB-EGF* людини, підтвердили наявність у складі бактеріальних клітин-продуктів цільового протеїнового продукту (рис. 2).

За даними літератури, *sHB-EGF* має аномальну електрофоретичну рухливість, що пов'язано з наявністю багатой на лізин гепаринз'язувальної ділянки у структурі *sHB-EGF*, яка за нейтральних значень рН несе позитивний заряд [11]. Рекомбінантний аналог *sHB-EGF* людини внаслідок аномальної електрофоретичної рухливості мав на 4,5 кДа «вищу молекулярну масу», за даними електрофорезу та імуноблотингу, що становила ≈ 18 кДа замість теоретично розрахованої 13,5 кДа. Аномальну електрофоретичну рухливість також мали флуоресцентні похідні: 55 кДа для *mCherry-sHB-EGF* замість теоретично розрахованої 50 кДа та 45 кДа для *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* , замість 40 кДа.

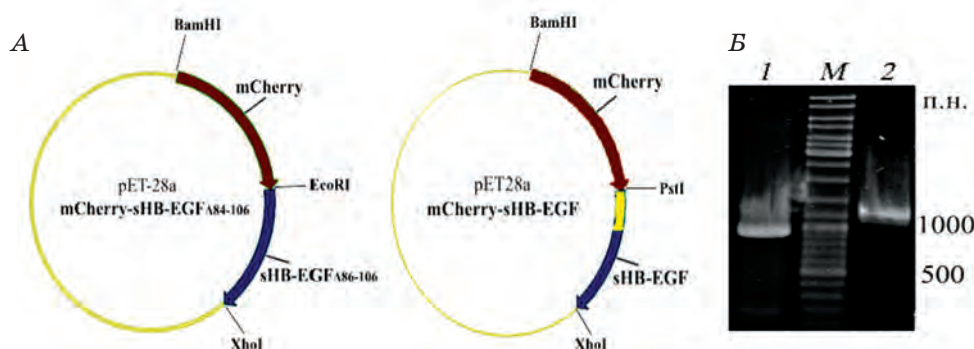


Рис. 1. А — схематичне зображення генетичних конструкцій на основі бактерійного експресійного вектора *pET-28a(+)*, що кодують рекомбінантні флуоресцентні похідні *sHB-EGF* людини: *mCherry-sHB-EGF* та *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* ; Б — електрофореграма ПЛР-продуктів об'єднаних нуклеотидних послідовностей *mCherry-sHB-EGF* та *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* : 1 — *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* ; М — маркери довжини нуклеотидних фрагментів; 2 — *mCherry-sHB-EGF*



Рис. 2. Вестерн-блот-аналіз лізатів бактеріальних клітин клонів-продуцентів рекомбінантних флуоресцентних похідних mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} (детекція поліклональною сироваткою миші, імунізованою рекомбінантним sHB-EGF): 1 — маркери молекулярної маси; 2 — mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} ; 3 — mCherry-sHB-EGF; 4 — рекомбінантний аналог sHB-EGF людини

Для подальшого використання рекомбінантні протеїни виділяли з розчинної фракції за допомогою афінного сорбенту Ni-NTI-агарози. Дисульфідні зв'язки у складі EGF-подібного домену молекул sHB-EGF та sHB-EGF Δ_{84-106} відновлювали з використанням суміші окисненого і відновленого глутатіону, яку додавали до препарату протеїну після попереднього етапу виділення. Чистоту отриманого препарату перевіряли електрофоретично.

Вихід розчинних рекомбінантних протеїнів mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} становив 2,1 мг і 3,5 мг відповідно у перерахунку на 1 л бактеріальної культури.

Дослідження біологічної активності одержаних флуоресцентних похідних рекомбінантного аналога sHB-EGF людини. Флуоресцентні похідні можна застосовувати для дослідження здатності секреторної форми HB-EGF людини індукувати процеси ядерної транслокації рецептора EGFR, процесів внутрішньоклітинного транспортування лігандрецепторного комплексу sHB-EGF/EGFR та ролі гепаринзв'язувальної ділянки в механізмах реалізації біологічної активності sHB-EGF. З огляду на це перевіряли біологічну активність mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} , зокрема їхню здатність специфічно зв'язуватись із рецептором EGFR на поверхні клітин A431. Клітини епідермоїдної карциноми людини A431 експресують рецептор EGFR у великій кількості і є класичною моделлю для дослідження біологічної дії ростових факторів, що слугують лігандами для EGFR, та механізмів їх участі у процесах канцерогенезу. Для підтвердження здатності флуоресцентних похідних mCherry-sHB-EGF та mCherry-

sHB-EGF Δ_{84-106} специфічно взаємодіяти із рецептором EGFR було використано моноклональні антитіла миші проти позаклітинного домену EGFR. Слід зазначити, що згідно з інструкцією виробника зв'язування антитіл із позаклітинним доменом EGFR не перешкоджає прояву його здатності зв'язувати позаклітинні ліганди. Вторинними антитілами слугували мічені FITC антитіла проти Fc-фрагментів імуноглобулінів миші. Отже, є можливість візуалізувати лігандрецепторний комплекс mCherry-sHB-EGF/EGFR або mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} /EGFR, який утворився після зв'язування флуоресцентних похідних із рецептором. Після додавання до культурального середовища антитіл та флуоресцентних похідних sHB-EGF клітини інкубували протягом 15 хв при 37 °C за 5% -ї концентрації CO₂ в атмосфері з метою створення сприятливих умов для життєдіяльності. Препарати для конфокальної мікроскопії готували як описано в розділі «Матеріали і методи». Аналіз препаратів дав змогу виявити колокалізацію двох міток: зеленої (FITC) мітки рецептора та червоної (mCherry) -ліганда у внутрішньоклітинних везикулярних структурах (жовтий колір, утворений колокалізацією двох міток), що свідчить про здатність mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} специфічно зв'язуватись із рецептором EGFR (рис. 3). Як показують конфокальні знімки, утворений лігандрецепторний комплекс мав здатність інтерналізуватись у клітину. Таким чином, результати конфокальної мікроскопії вказують на наявність біологічної активності отриманих рекомбінантних флуоресцентних похідних, зокрема їхню здатність специфічно зв'язуватись із рецептором EGFR та індукувати його подальшу інтерналізацію в клітину. Слід зазначити, що відсутність гепаринзв'язувального домену в складі mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} не впливала на здатність флуоресцентного похідного взаємодіяти з рецептором EGFR.

Відомо, що sHB-EGF є активним мітогеном та хемоатрактантом для багатьох типів клітин. Тому наступним етапом роботи було дослідження здатності одержаних рекомбінантних флуоресцентних похідних стимулювати проліферацію клітин. Із цією метою нами було проведено дослідження з використанням МТТ-тесту і клітин ЗТЗ. За культивування клітин до ростового середовища додавали рекомбінантні флуоресцентні похідні mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} у концентрації 1 мкг/мл відповідно. Результати МТТ-тесту свід-

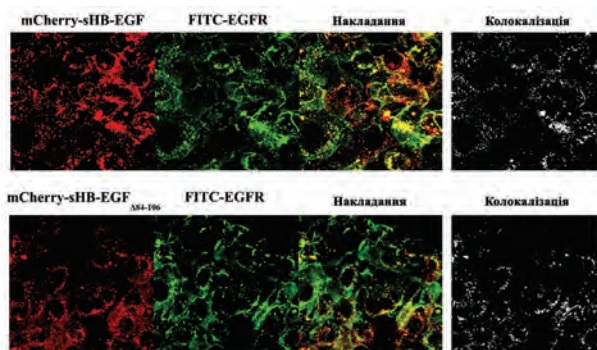


Рис. 3. Конфокальні знімки препаратів клітин A431, забарвлених флуоресцентними похідними sHB-EGF:

mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} — червоний канал; FITC-EGFR — зелений канал; накладання — об'єднане зображення по зеленому та червоному каналах; колокалізація — накладання флуоресцентних міток по зеленому та червоному каналах (білий колір)

чать про мітогенну активність флуоресцентних похідних (рис. 4). Проте флуоресцентне похідне mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} , імовірно, має значно меншу мітогенну активність, ніж mCherry-sHB-EGF. Можна припустити, що відсутність гепаринзв'язувальної ділянки у складі sHB-EGF призводить до зниження його мітогенного потенціалу. На підставі даних МТТ-тесту можна зробити висновок про можливість використання рекомбінантних флуоресцентних похідних

REFERENCE

1. Higashiyama S., Abraham J. A., Miller J., Fiddes J. C., Klagsbrun M. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science*. 1991, 251(251), 936–939.
2. Higashiyama S., Nanba D. ADAM-mediated ectodomain shedding of HB-EGF in receptor cross-talk. *Biochim Biophys Acta*. 2005, 1751(1), 110–117.
3. Roepstorff K., Grandal M. V., Henriksen L., Knudsen S. L., Lerdrup M., Grøvdal L., Willumsen B. M., van Deurs B. Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic*. 2009, 10(8), 1115–1127.
4. Lin S.Y., Makino K., Xia W., Matin A., Wen Y., Kwong K. Y., Bourguignon L., Hung M. C. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol*. 2001, 3(9), 802–808.
5. Kim J., Adam R. M., Freeman M. R. Trafficking of nuclear heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor into an epidermal growth factor receptor-dependent autocrine loop in response to oxidative stress. *Cancer Res*. 2005, 65(18), 8242–8249.
6. Korotkevych N. V., Kolybo D. V., Labyntsev A. Ju., Romaniuk S. I., Komisarenko S. V.

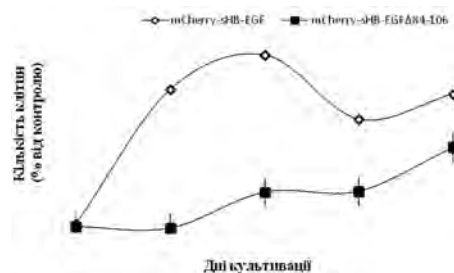


Рис. 4. Залежність кількості клітин від часу культивування з рекомбінантними флуоресцентними похідними за результатами МТТ-тесту з використанням клітин 3Т3

mCherry-sHB-EGF і mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} в експериментах, спрямованих на дослідження механізмів реалізації біологічної активності sHB-EGF людини та ролі гепаринзв'язувальної ділянки у цих процесах.

Таким чином, у результаті проведеної роботи створено біологічно активні рекомбінантні флуоресцентні похідні секреторної форми sHB-EGF людини mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} і показано можливість їх використання у дослідженнях молекулярних механізмів реалізації біологічної активності sHB-EGF і ролі гепаринзв'язувальної активності у процесах зв'язування sHB-EGF з рецептором та внутрішньоклітинного транспортування лігандрецепторного комплексу.

Obtaining of recombinant human heparin-binding EGF-like growth factor and perspectives of its application in biotechnology. *Biotechnology*. 2010, 5(4), 44–54. (In Ukrainian).

7. Korotkevych N. V., Labyntsev A. Ju., Kaberniuk A. A., Oliinyk O. S., Romaniuk S. I., Kolybo D. V., Komisarenko S. V. Cytotoxicity of the B subunit of diphtheria toxin to human histiocytic lymphoma U937. *Ukr. Biokhim. Zh.* 2009, 81(4), 69–80. (In Ukrainian).
8. Dower W. J., Miller J. F., Ragsdale C. W. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 1988, 16(13), 6127–6145.
9. Schagger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 1987, 166(2), 368–379.
10. Harlow E., Lane D. *Antibodies: a laboratory manual*. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. 1988, 726 p.
11. Higashiyama S., Lau K. E., Besner G. A., Abraham J., Klagsbrun M. Structure of heparin-binding EGF-like growth factor. Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein. *J. Biol. Chem.* 1992, 267(9), 6205–6212.

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА
СЕКРЕТОРНОЙ ФОРМЫ HB-EGF
ЧЕЛОВЕКА**

*Н. В. Короткевич
А. Ю. Лабынцев
Д. В. Колибо
С. В. Комисаренко*

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: gnr.nata@gmail.com

Гепаринсвязывающий фактор роста, подобный эпидермальному ростовому фактору — HB-EGF (Heparin-Binding Epidermal growth factor-like Growth Factor), относится к семейству эпидермальных ростовых факторов и синтезируется в виде мембранно-заякоренного предшественника pro-HB-EGF. Связывание секреторной формы фактора — sHB-EGF (soluble HB-EGF) с рецепторами EGFR и HER-4 приводит к образованию соответствующих лигандрецепторных комплексов и активации сигнальных путей, которые играют важную роль в регулировании пролиферации, дифференциации и миграции клеток.

Целью работы было получение рекомбинантных флуоресцентных производных на основе полноразмерной секреторной формы sHB-EGF человека (mCherry-sHB-EGF) и укороченной формы sHB-EGF Δ_{84-106} (mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}), которая не содержала бы гепаринсвязывающей области.

Показана способность обоих флуоресцентных производных специфически связываться с EGFR-рецептором клеток и рецепторопосредованно интернализироваться внутрь клетки, а также усиливать пролиферацию клеток мыши линии 3T3. При этом отсутствие гепаринсвязывающего участка в структуре mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} существенно не влияло на его способность связываться с рецептором, однако снижало его митогенную активность почти в два раза. Полученные флуоресцентные производные sHB-EGF могут быть удобным инструментом для исследования молекулярных механизмов реализации биологической активности sHB-EGF и роли гепаринсвязывающей активности в процессах взаимодействия sHB-EGF с рецептором, а также дальнейшего внутриклеточного транспортирования лигандрецепторного комплекса.

Ключевые слова: гепаринсвязывающий EGF-подобный фактор роста (HB-EGF), рецептор эпидермального фактора роста.

**OBTAINING AND CHARACTERIZATION
OF RECOMBINANT FLUORESCENT
DERIVATIVES OF SOLUBLE HUMAN
HB-EGF**

*N. V. Korotkevich
A. Ju. Labyntsev
D. V. Kolibo
S. V. Komisarenko*

Palladin Institute of Biochemistry
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: gnr.nata@gmail.com

Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) belongs to the epidermal growth factor receptor family and is synthesized as a transmembrane precursor proHB-EGF. Binding of sHB-EGF with receptors EGFR and HER-4 results in formation of ligand-receptor complexes and activation of signaling pathways and thereby promotes survival, proliferation and migration of cells.

The aim of the study was to obtain the recombinant fluorescent derivatives of full-length soluble sHB-EGF — mCherry-sHB-EGF and truncated sHB-EGF Δ_{84-106} (without heparin-binding domain) — mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} . The recombinant fluorescent derivatives may be used to investigate the sHB-EGF binding with receptors EGFR and HER-4, intracellular transportation of ligand-receptor complexes and the role of sHB-EGF heparin-binding domain in sHB-EGF biological activity.

It was shown the ability of both fluorescent derivatives specifically bind to EGFR, to internalize in receptor-mediated pathway and to enhance the proliferation of 3T3 cells. Absence of heparin-binding domain in structure of mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} significantly did not effect on its ability to bind with receptor, but decreased twice its mitogenic activity. Thus, obtained fluorescent derivatives of sHB-EGF could be a convenient tool for investigation of molecular mechanisms of sHB-EGF biological activity and role of heparin-binding domain in these processes.

Key words: heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), epidermal growth factor receptor.