



УДК 577.214.622+577.27+615.37

КОНСТРУИРОВАНИЕ ГЕНА ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННОГО АНТИГЕНА VNTR(MUC1) ЧЕЛОВЕКА, СЛИТОГО СО СТРЕПТАВИДИНОМ, ЕГО ЭКСПРЕССИЯ В *Escherichia coli*. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ГИБРИДНОГО БЕЛКА

© 2000 г. Л. Б. Гулько, О. В. Павлова, Н. А. Дьяков, Н. А. Окорокова, К. И. Ратманова,
Н. Н. Логунова, Р. А. Бобренева, В. А. Макаров, В. Л. Юрин, В. П. Вейко[#], В. Г. Дебабов

ГНЦ генетики и селекции промышленных микроорганизмов РФ,
113545, Москва, 1-й Дорожный пр., д. 1

Поступила в редакцию 12.11.99 г. Принята к печати 10.01.2000 г.

Сконструирован ген опухолеассоциированного антигена VNTR(MUC1) человека, слитого со стрептавидином, создана плаزمида для его экспрессии и получен высокоэффективный штамм-продуцент гибридного белка. Показано, что лидерный пептид стрептавидина обеспечивает эффективную секрецию гибридного белка в периплазматическое пространство клеток *Escherichia coli*. Гибридный белок выделен в индивидуальном состоянии и изучены его иммуногенные свойства.

Ключевые слова: гибридный белок; стрептавидин; опухолеассоциированный антиген; VNTR; MUC1; *Escherichia coli*.

ВВЕДЕНИЕ

Обнаружение взаимосвязи процессов образования злокачественных опухолей человека с изменениями в экспрессии генов семейства *tms* инициировало изучение продуктов этих генов – муцинов – в качестве потенциальных мишеней для терапии, а также как источников для получения вакцин против различных видов опухолей эпителиального происхождения. В полной мере это наблюдение справедливо для трансмембранного гликопротеина человека MUC1, который представлен на апикальной поверхности эпителиальных клеток различных органов, включая молочные и слюнные железы, яичники, поджелудочную железу, легкие [1–3]. Современные данные показывают, что опухолевая трансформация эпителиальных клеток сопровождается не только усилением экспрессии гена *tms1*, но и нарушением поляризованного распределения его продукта MUC1 на поверхности клеток [4]. В экстрацеллюлярной части белок MUC1 несет значительное число (60–100) тандемных повторов (TR) из 20 а. о. (VNTR-область белка), каждый из которых имеет в норме пять сайтов потен-

циального O-гликозилирования [5, 6]. В опухолевых клетках обнаружено aberrантное гликозилирование MUC1, приводящее к обнажению отдельных эпитопов VNTR-области коровьего белка [1–3, 7], а также выявлены формы белка (MUC1Y, MUC1X), лишенные VNTR-области или других фрагментов аминокислотной последовательности [8]. Эти изменения структуры переводят белок MUC1 в категорию опухолеассоциированных антигенов, которые могут быть выявлены с помощью диагностических моноклональных антител [9–11].

Исследования, выполненные в ряде лабораторий, показали еще одну крайне важную особенность структуры MUC1 – его мультивалентность, основанную на доменной организации повторяющихся элементов VNTR-области. Этот факт, по видимому, объясняет развитие у онкологических больных крайне слабых анти-MUC1-гуморальных (IgM-типа) ответов и своеобразных Т-клеточных ответов [1–4, 11, 12]. Такой вариант противоопухолевого иммунного ответа (в основе которого, по всей видимости, лежит мультивалентное лигирование антигенраспознающих рецепторов Т- и В-клеток) можно рассматривать как неклассический, или как незавершенный [1, 12, 13]. Параллельно была обнаружена способность пептидных фрагментов VNTR-области MUC1 образовывать комплексы с белками главного комплекса гистосовместимости, которые могут распознаваться опухолеспецифическими цитотоксическими и хелперными Т-клетками им-

Сокращения: VNTR (variable number tandem repeat) – локус белка MUC1 с изменяющимся числом тандемных повторов; TR – мономер тандемных повторов; SAV – стрептавидин; SAV-(TR)₂₂ – гибридный белок; KLH – гемоцианин улитки; TyR – тироглобулин быка; символ “d” в формулах дезоксирибополигуклеотидов опущен.

[#] Автор для переписки (e-mail: veiko@genetika.ru; тел.: (095) 314-81-73, 394-81-14).

мунной системы [2, 4, 14]. В связи с указанными экспериментальными данными вполне обоснованными выглядят попытки повышения эффективности анти-MUC1-противоопухолевого иммунного ответа с помощью современных стратегий полипептидных и ДНК-вакцинаций, направленных на оптимизацию как презентации опухолеассоциированного антигена MUC1, так и генерации эффекторных MUC1-специфических иммунных клеток [1, 2, 15 – 17].

Основная цель данной работы – получение полипептида, соответствующего области VNTR(MUC1), со свойствами, перспективными как для создания препаратов с потенциальной противоопухолевой вакцинирующей активностью, так и для использования в качестве компонента иммунодиагностик широкого круга опухолей человека эпителиально-клеточного происхождения.

В связи с этим задачами проведенного исследования являлись:

1. Разработка и реализация схемы химико-ферментативного конструирования генетических детерминант VNTR-области MUC1 человека различной степени полимерности.

2. Создание эффективной системы экспрессии и периплазматического накопления клетками *Escherichia coli* негликозилированного полипептида VNTR(MUC1) в форме белка, слитого со стрептавидином (SAV) *Streptomyces avidinii*.

3. Изучение ряда функциональных и иммунохимических свойств химерного продукта SAV-VNTR(MUC1) и первоначальная оценка его иммуногенной активности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом работы при создании гибридного полипептидного антигена явилось конструирование однозначно ориентированных тандемных повторов гена *mucl* человека, кодирующих VNTR-область белка MUC1. Современная техника ПЦР в сочетании с сайт-направленным мутагенезом ДНК позволяет получить заданный фрагмент с модификациями в один-два приема, но требует обязательного последующего подтверждения нуклеотидной последовательности секвенированием, поскольку при работе с ДНК-полимеразами велика вероятность случайных нуклеотидных замен [18]. В данной работе при конструировании многократно тандемно повторенного фрагмента ДНК значительного размера нами избрана тактика осознанного ограничения использования ДНК-полимераз. ДНК-полимераза используется только на начальной стадии синтеза мономера, структура которого легко подтверждается секвенированием. Все дальнейшие модификации фрагмента осуществляются через ряд клонирований в составе специально сконструированных плазмид-

ных ДНК. Однозначность структуры получаемой при этом последовательности ДНК заложена в способе конструирования, последующего ее подтверждения, которое для ДНК подобного типа значительно затруднено либо недостоверно [19], не требуется.

Нуклеотидную последовательность *vntr(mucl)*, соответствующую мономеру VNTR(MUC1) человека (рис. 1а) (номера депонирования в EMBL M61170; X54350; X54351), синтезировали из двух частично комплементарных друг другу олигонуклеотидов (1) и (2) (рис. 1б) с помощью *Taq*-ДНК-полимеразы. Структуры олигонуклеотидов (1) и (2) спланированы с учетом частоты встречаемости кодонов для *E. coli* и фланкированы участками узнавания рестриктаз *BclI* и *BamHI*, позволяющими проводить полимеризацию мономера после обработки этими рестриктазами и получать полинуклеотидные фрагменты произвольной кратности. Мономер *vntr(mucl)* клонировали по тупым концам в составе мультикопийного вектора pUC57 (EMBL Y14837) в клетках *E. coli* JM110 (рис. 1в) и секвенировали. Структура вставки в плазмиде pUC57-TR₁ соответствует запланированной последовательности мономера *vntr(mucl)* человека (рис. 1а).

Плазмидную ДНК pUC57-TR₁ расщепляли рестриктазами *BclI* и *BamHI*, мономер *vntr(mucl)* выделяли путем электрофоретического разделения и элюции из 3% агарозного геля и полимеризовали в течение семи циклов лигирования–расщепления обоими ферментами позволило провести однозначную сборку мультимера по типу голова–хвост, так как только при такой сборке возникают гибридные сайты, не расщепляемые ни одной из использованных эндонуклеаз рестрикции. Полученную смесь полимеризованных фрагментов клонировали в клетках *E. coli* JM110 в составе плазмидной ДНК pR18ATG (рис. 2). Данное промежуточное клонирование преследовало две цели:

– получение плазмидосодержащих клонов со строго определенным числом повторов мономера *vntr(mucl)*;

– сайтовое обеспечение последующей стыковки фрагмента гена *vntr(mucl)* с ДНК гена стрептавидина (фланкирование клонированного фрагмента участками узнавания для рестриктазы *HindIII*).

В результате скрининга рекомбинантных клонов отобраны плазмидные ДНК, содержащие вставки *vntr(mucl)* различной кратности (от 3 до 28 TR). Для конструирования гибридного гена выбран фрагмент *vntr(mucl)* размером 1320 п. о., что соответствует 22-кратному тандемному повтору. Такой выбор обусловлен существующими представлениями, в соответствии с которыми нижний

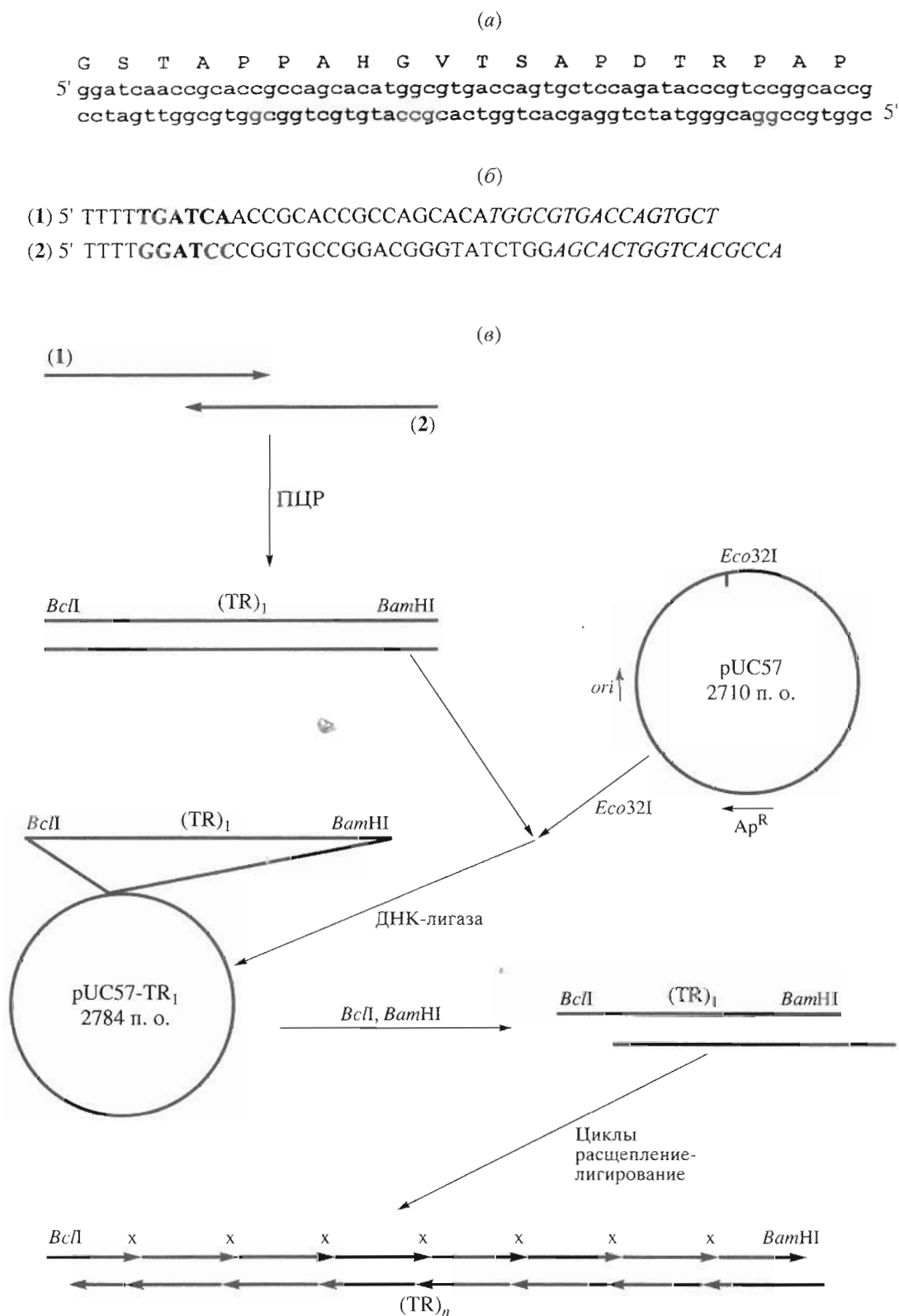


Рис. 1. Схема конструирования фрагмента *vntr(muc1)* человека: (а) Аминокислотная последовательность мономера VNTR-области MUC1 и соответствующая ей нуклеотидная последовательность мономера *vntr(muc1)*. (б) Структуры олигонуклеотидов, использованных при конструировании мономера *vntr(muc1)*; курсивом отмечены комплементарные участки олигонуклеотидов, жирным шрифтом выделены участки узнавания для *BclI* и *BamHI*. (в) Схема конструирования фрагмента ДНК, кодирующего (TR)_n *vntr(muc1)* человека; x – гибридные сайты *BamHI/BclI*.

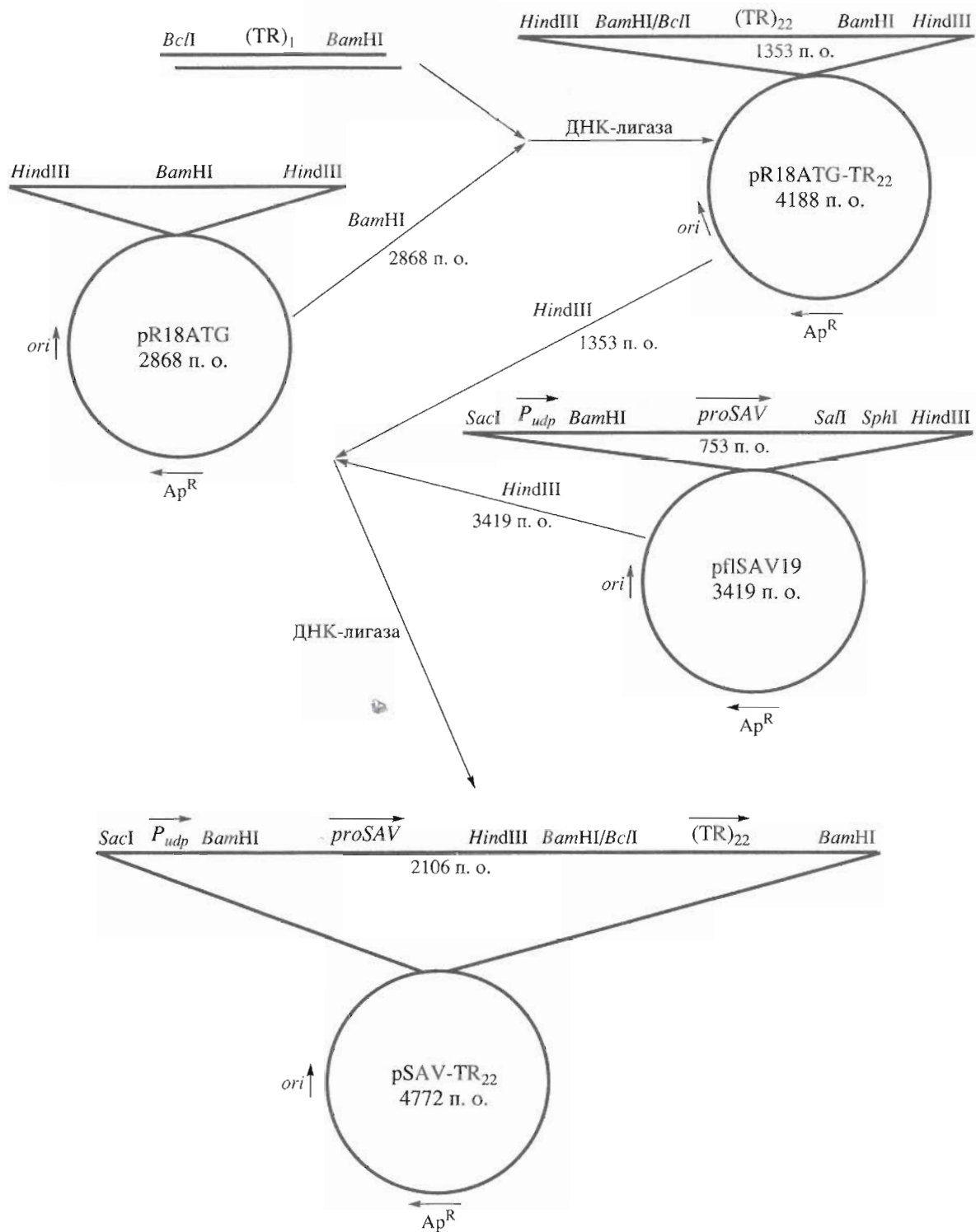


Рис. 2. Схема конструирования экспрессионной плазмиды, содержащей ген гибридного белка SAV-TR₂₂. *P_{udp}* – модифицированная промотор-операторная область гена *udp* из *E. coli*; *proSAV* – структурная часть гена стрептавидина из *S. avidinii*.

уровень полимерности VNTR(MUC1) должен соответствовать 5–7-кратным повторам (только синтетические полипептиды VNTR₅₋₇ обладают выраженной иммуногенной активностью [20]), в

то время как верхняя граница диапазона может быть ограничена размерами и стабильным наследованием гибридной плазмиды, содержащей повторы, в системе *E. coli*.

Выбор второго компонента гибридного белка – стрептавидина (SAV) – обусловлен известными и широко применяемыми в биологии и медицине свойствами этого белка: аффинность тетрамерного SAV к *d*-биотиину чрезвычайно высока ($K_d 10^{-15}$ М) и справедливо относится к наиболее сильным нековалентным взаимодействиям между белками и лигандами. Кроме того, SAV характеризуется высокой стабильностью: он сохраняет функциональную структуру при повышенных температурах, экстремальных значениях pH, в присутствии высоких концентраций денатурирующих агентов и органических растворителей [21–24].

Для конструирования рекомбинантного гена *sav-vntr(muc1)* мы использовали созданный нами ранее вектор pflSAV19 [25, 26]. Как показано в предыдущих исследованиях, данная экспрессионная система на основе модифицированного промотора гена *udp* из *E. coli* и гена *sav*, включающего нативную лидерную последовательность, обеспечивает в клетках *E. coli* высокий уровень накопления и экскреции как растворимого SAV [27], так и растворимого гибридного белка SAV-щелочная фосфатаза [25]. Плазмидная ДНК pflSAV19 содержит модифицированный ген прострептавидина, у которого элиминирован стоп-кодон и сохранен на 3'-конце гена полилинкер для ряда рестриктаз (рис. 2). На последнем этапе конструирования гибридного гена *sav-vntr(muc1)* фрагмент *vntr(muc1)* вырезали с помощью рестриктазы *Hind*III из плазмиды pR18ATG-TR₂₂ и клонировали в составе pflSAV19 в клетках *E. coli* C600. Отобранная целевая плаزمида обозначена pSAV-TR₂₂ (рис. 2). Стабильность наследования плазмидной ДНК подтверждена в семи пассажах в селективных условиях на агаризованной и жидкой средах.

Проверка уровня накопления и локализации гибридного белка SAV-TR₂₂(MUC1) с молекулярной массой около 70 кДа подтвердила его наличие именно в периплазматической фракции клеток *E. coli* (рис. 3). Гибридный белок выделяли из смеси белков периплазматической фракции аффинной хроматографией с использованием 2-иминобиотинагарозы. Выход SAV-TR₂₂(MUC1) составил 70–80 мг/л культуральной жидкости.

Исследование связывания выделенного гибридного белка SAV-TR₂₂ с *d*-биотином [28] показало, что 1 ммоль тетрамера SAV-TR₂₂ связывает 3.5–3.7 ммоль остатка биотина.

С целью иммунохимической характеристики VNTR-области гибридного продукта SAV-TR₂₂ исследована его способность к взаимодействию с антителами, специфичными к коровому негликозилированному белку MUC1 человека. В этих экспериментах использовали сыворотку мышей Balb/c, иммунизированных опухолевыми клетками человека линии T47D, которые синтезируют

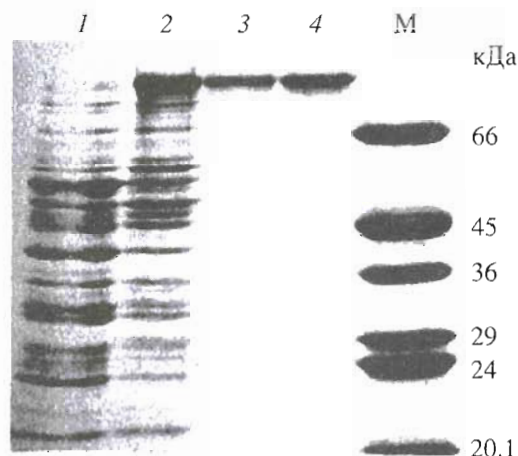


Рис. 3. Электрофоретическое разделение в денатурирующем 12.5% ПААГ белков периплазматических фракций: штамма-реципиента (1); штамма-производителя гибридного белка SAV-TR₂₂ (2), выделенного белка SAV-TR₂₂ – 2 и 4 мкг (3 и 4 соответственно). М – белки-маркеры.

значительные количества MUC1 в негликозилированной форме [29]. Данные, представленные на рис. 4а, показывают, что анти-T47D-сыворотка способна специфически взаимодействовать с синтетическим пептидом pMuc.1, аминокислотная последовательность которого соответствует мономеру VNTR(MUC1), и с полученными нами (см. “Эксперимент. часть”) конъюгатами этого пептида с белками-носителями SAV, KLH и TyR, но не взаимодействует с самими этими белками. То есть, она содержит антитела к негликозилированной VNTR-области природного белка MUC1 и может быть использована для корректной иммунохимической характеристики VNTR-области гибридного продукта SAV-TR₂₂. Действительно, данные ИФА (рис. 4б) свидетельствуют об эффективном и иммуноспецифическом взаимодействии анти-MUC1-антител таких анти-T47D-сывороток с VNTR-элементами гибридного SAV-TR₂₂-материала.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что структура и, по-видимому, конформация VNTR-области химерного продукта SAV-TR₂₂ соответствуют природному варианту VNTR-области белка MUC1 человека, экспрессируемого в негликозилированной форме на поверхности опухолевых клеток и являющегося антигенным маркером широкого спектра опухолей человека эпителиально-клеточного происхождения [9, 10, 29].

В серии экспериментов исследовали иммуногенную активность гибридного SAV-TR₂₂, а именно его способность вызывать антительный иммунный ответ к негликозилированной форме белка MUC1. В предварительных опытах было

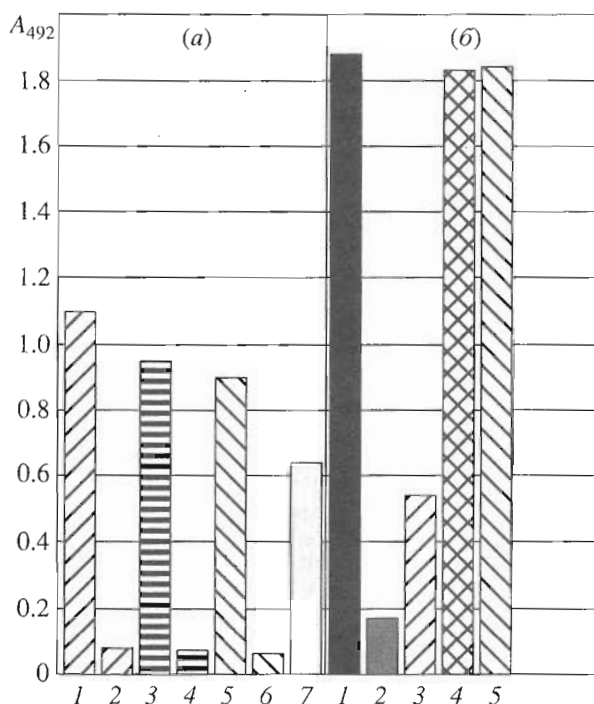


Рис. 4. Иммуноферментный анализ гибридного белка SAV-TR₂₂ с помощью антисывороток мышей, содержащих антитела к негликозилированной VNTR-области природного белка MUC1 человека. (а) Анти-VNTR(MUC1)-специфическая активность анти-T47D-сыворотки. Показаны уровни связывания антител сыворотки (разведение 1 : 200) с иммобилизованными конъюгатами рMuc.1 с KLH (pMuc.1-Cys-KLH), TyR (pMuc.1-Cys-TyR) и SAV (SAV-Biot-аср-рMuc.1) (столбцы 1, 3 и 5 соответственно), а также белками KLH (2), TyR (4), SAV (6) и пептидом рMuc.1 (7). (б) Иммуноспецифическое взаимодействие анти-VNTR(MUC1)-антител анти-T47D-сыворотки с рекомбинантным белком SAV-TR₂₂: уровень связывания антител сыворотки (разведение 1 : 200) с иммобилизованным SAV-TR₂₂ (1); ингибирование взаимодействия антител с иммобилизованным SAV-TR₂₂ белками SAV-TR₂₂ (2), рMuc.1-Cys-KLH (3), KLH (4), SAV (5). Ингибиторы добавлены к анти-T47D-сыворотке до конечной концентрации 10 мг/мл за 1 ч до проведения ИФА в стандартных условиях (см. "Эксперимент. часть").

показано, что иммунизация животных пептидом рMuc.1 или его конъюгатами с KLH, TyR и SAV не приводит к развитию выраженных и воспроизводимых антительных ответов (титры анти-рMuc.1-антител в отдельных сыворотках не превышали величин 1 : 250–1 : 500). Принципиально иные результаты были получены при использовании в качестве антигена рекомбинантного белка SAV-TR₂₂. На рис. 5 представлены типичные данные ИФА сывороток, полученных на 7-е сутки после повторной иммунизации мышей Balb/c гибридным SAV-TR₂₂ (основные параметры иммунизации в этом случае соответствовали параметрам иммунизации животных с использова-

нием пептида рMuc.1, конъюгированного с белками-носителями). Эти результаты свидетельствуют о высокой иммуногенной активности химерного белка SAV-TR₂₂: анти-VNTR-титры сывороток после вторичной иммунизации достигают величин 1 : 20000–1 : 40000. При этом, судя по характеру кривых ИФА, значительная доля анти-VNTR-антител в таких сыворотках обладает высокой аффинностью/авидностью к полимерному TR₂₂-элементу гибридного белка. Эти данные подтверждают представления о решающем значении полимерности структуры белка MUC1 (негликозилированные VNTR) для запуска иммунных реакций, ведущих к формированию опухолеспецифического гуморального иммунного ответа и, по-видимому, к генерации противоопухолевых эффекторных Т-клеток [1–3, 11–14]. Важно подчеркнуть, что антитела исследованных сывороток эффективно взаимодействуют также с белком MUC1 поверхности карциномных клеток T47D человека, т.е. с природным аналогом полученного рекомбинантного продукта (рис. 5).

Таким образом, в результате проведенного исследования получены следующие результаты и материалы:

- осуществлено конструирование штамма *E. coli* – высокоэффективного продуцента опухолеассоциированного антигена VNTR(MUC1) человека, слитого с SAV;

- получен гибридный белок SAV-TR₂₂, который в соответствии с представленными данными, является тетрамерной (по стрептавидиновому элементу) биотинсвязывающей молекулой, содержащей на С-конце каждого мономера негликозилированный фрагмент TR₂₂(MUC1) опухолеассоциированного антигена человека;

- показана высокая иммуногенная активность рекомбинантного белка SAV-TR₂₂, которая обеспечивается высокой полимерностью его VNTR-компонента, а также его конформацией, соответствующей, по-видимому, конформации негликозилированной VNTR-области природного белка MUC1, обнаруживаемого на поверхности опухолевых клеток.

Результаты данного исследования открывают перспективы использования рекомбинантного белка SAV-TR₂₂ в качестве исходного продукта для:

- отработки современных схем вакцинаций с оптимизированными процессами презентации опухолеассоциированного антигена и индукции соответствующих антигенраспознающих клеток иммунной системы;

- конструирования материалов с потенциальной противоопухолевой вакцинирующей активностью;

– создания высокочувствительных иммуноспецифических тест-систем для диагностики широкого круга опухолей человека эпителиально-клеточного происхождения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Использовали агарозу, акриламид, *N,N'*-метиленбисакриламид, SDS, EDTA, АТФ, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, препараты SAV, KLH, ТуR, бычьего сывороточного альбумина (BSA), *N*-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат, 2-иминобиотинагарозу, *o*-фенилендиамин (Sigma, США), *d*-[карбонил-¹⁴C]биотин (Amersham, Англия), соли (Merck, Германия), набор белковых маркеров (Pharmacia, Швеция), мембраны и ячейки для ультрафильтрации (Amicon, США), планшеты для ИФА (Costar, США). Остальные реактивы отечественного производства.

Ферменты. Эндонуклеазы рестрикции, *Taq*-ДНК-полимераза, ДНК-лигаза и полинуклеотидкиназа фага Т4 (НПО “Ферментас”, Литва), пероксидаза хрена (Sigma, США).

Бактериальные штаммы и плазмиды. *E. coli* JM110 (*dam dcm supE44 hsdR17 thi leu rpsL lacY galK galT ara tonA thr tsx Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB' lacIq lacZ ΔM15]*), *E. coli* C600 (*thi thrB leuB lacY supE tonA recA Tn10*) и pUC57 получены из ВКПМ ГНЦГенетика. Плазмидная ДНК pR18ATG сконструирована в данной работе, pI SAV19 – ранее [25].

Бактериальные клетки культивировали при 37°C с использованием жидкой либо агаризованной среды Луриа [30]. Для обеспечения селективного роста клеток применяли ампициллин (100 мкг/мл). Все процедуры, связанные с манипуляциями ДНК (выделение и очистка ДНК, расщепление рестриктазами, лигирование, трансформация бактериальных клеток плазмидной ДНК), проводили согласно [30].

Синтез и очистку дезоксирибоолигонуклеотидов проводили согласно [31].

Конструирование мономера *vntr(mucl)*. Нуклеотидную последовательность мономера *vntr(mucl)*, включающую участки узнавания для *Bcl*I и *Bam*HI, синтезировали из двух дезоксирибоолигонуклеотидов (1) и (2) (рис. 1б). Для этого смешивали по 50 пмоль каждого олигонуклеотида и проводили реакцию достройки с помощью *Taq*-ДНК-полимеразы в 0.1 мл буфера, содержащего 10 мМ Трис-НСl (рН 8.4), 50 мМ КСl, 0.2 мМ dNTP, 2.5 ед. акт. *Taq*-ДНК-полимеразы, 3 мМ MgCl₂. Режим достройки (°С/с): 5 циклов – денатурация 95/10, отжиг 52/10, элонгация 72/10. Элюированный из 3% агарозного геля и очищенный методом фенольной депротеинизации фрагмент размером 74 п. о. клонировали в клетках *E. coli* JM110 в со-

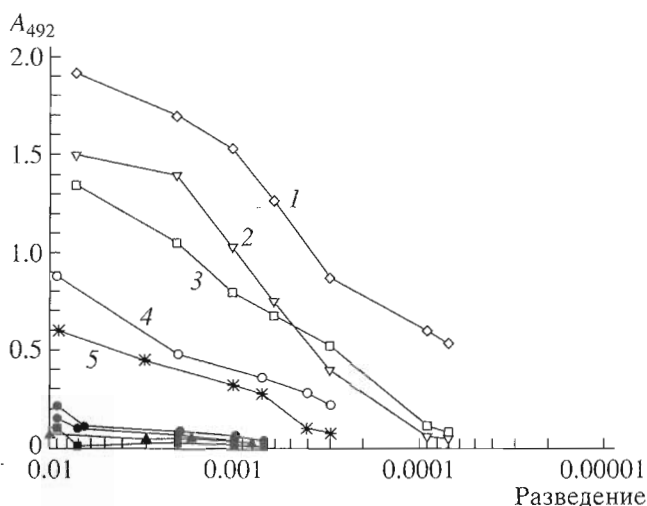


Рис. 5. Иммуноферментный анализ анти-SAV-TR₂₂-сывороток в диапазоне их разведений (1 : 100–1 : 40000) для следующих иммобилизованных материалов: SAV-TR₂₂ (1); SAV-Biot-аср-pMuc.1 (2); пептид pMuc.1 (3); карциномные клетки T47D (4); SAV (5). Соответствующие закрашенные символы – уровень связывания иммуноглобулинов нормальной сыворотки со всеми исследованными материалами (контроль).

ставе плазмиды pUC57 (лигирование ДНК pUC57, расщепленной *Eco*32I, и фрагмента TR₁ проводили в молярном соотношении 1 : 20). Нуклеотидную последовательность фрагмента TR₁ определяли по Сэнгеру [32] с использованием универсального праймера (5'GTAAAACGACGGCCAGT).

Конструирование мультимера *vntr(mucl)* человека. ДНК pUC57-TR₁ (50 мкг) расщепляли рестриктазами *Bcl*I и *Bam*HI. Выделенный после электрофоретического разделения в 3% агарозном геле фрагмент размером 60 п.о. лигировали с помощью ДНК-лигазы фага Т4 с последующим расщеплением рестриктазами *Bcl*I и *Bam*HI в условиях, рекомендуемых фирмой-изготовителем. Полимеризацию TR₁ контролировали с помощью электрофореза в 1.5% агарозном геле. Полученную после 7 циклов расщепление–лигирование смесь лигировали с плазмидной ДНК pR18ATG, расщепленной рестриктазой *Bam*HI. В качестве реципиентного штамма для отбора трансформантов использовали штамм *E. coli* JM110, содержащий *dcm*-мутацию, препятствующую метилированию сайта рестриктазы *Bcl*I. В результате трансформации отобрана коллекция клонов, содержащих рекомбинантные плазмиды с разным числом правильно ориентированных мономеров (TR₃–TR₂₈) *vntr(mucl)*. Для создания гибридного гена выбран клон с плазмидой pR18ATG-TR₂₂.

Создание гибридного гена *sav-vntr(mucl)*. Фрагмент TR₂₂, полученный из плазмиды pR18ATG-TR₂₂, расщепленной *Hind*III, лигирова-

ли с помощью ДНК-лигазы фага T4 в условиях фирмы-изготовителя фермента с плазмидой pflSAV19 [25, 26], расщепленной той же рестриктазой. Лигазной смесью трансформировали штамм *E. coli* C600. Отбор клонов осуществляли методом ПЦР по ранее отработанным схемам [33]. Методом рестриктового анализа и секвенирования областей состыковки фрагментов гибридного гена подтверждена структура целевой плазмиды.

Получение белков периплазматической фракции клеток *E. coli* осуществляли по руководству [30].

Электрофоретический анализ белков осуществляли согласно Леммли [34].

Выделение белка SAV-VNTR₂₂ и его очистку проводили методом аффинной хроматографии с использованием 2-иминобиотинагарозы как описано в [35].

Концентрацию растворов белков определяли по Бредфорд [36].

Связывание гибридного белка с *d*-биотином определяли как описано в [28].

Синтетические пептиды и конъюгаты. Полипептид pMuc.1 со структурой H-GVTSAPDTRPARPGSTAPPANGVTSА-OH, соответствующей мономеру VNTR-области белка MUC1, синтезировали твердофазным методом на пептидном синтезаторе 430A Applied Biosystems. С целью получения конъюгатов pMuc.1-белок-носитель синтезировали варианты данного пептида путем введения в ходе синтеза остатка цистеина (pMuc.1-Cys) или биотиновой группировки с аминокпроиловым спейсером (Biot-аср-pMuc.1) по C- и N-концам pMuc.1 соответственно. Очистку пептидов проводили обращенно-фазовой ВЭЖХ. Чистота полученных пептидов подтверждена ВЭЖХ и анализом аминокислотного состава. Комплексы SAV-Biot-аср-pMuc.1 получены в результате аффинного взаимодействия SAV с 10-кратным молярным избытком Biot-аср-pMuc.1, а конъюгаты pMuc.1-Cys-KLN и pMuc.1-Cys-TyR – с помощью гетеробифункционального реагента *N*-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионата [37]. Конъюгированные материалы очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-25. Эффективность образования комплекса pMuc.1 с белком-носителем оценивали с помощью ВЭЖХ по уменьшению содержания пептидного компонента в аликвоте реакционной смеси. Плотность посадки pMuc.1 на белки-носители составила для KLN – 160, для TyR – 26 и для SAV – 4 моль/моль белка.

Иммунизация животных. Мышей линии Balb/c иммунизировали клетками культивируемой линии T47D (ATCC HTB 133) аденокарциномы человека путем многократных, с интервалом в 2 не-

дели, внутривнутрибрюшинных инъекций суспензии опухолевых клеток (5×10^6 клеток на мышь). Первичную иммунизацию проводили смесью (1 : 1) суспензии клеток с полным адьювантом Фрейнда. Уровень антипептидных антител к коровой, негликозилированной VNTR-области MUC1, экспрессируемого клетками T47D [29], определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с использованием иммобилизованного pMuc.1 и его конъюгатов с KLN, TyR и SAV. Титры таких сывороток (после 10–12 иммунизаций клетками T47D) составляли 1 : 1000–1 : 5000.

Иммунизацию мышей Balb/c рекомбинантным очищенным белком SAV-TR₂₂ и конъюгатами pMuc.1 с KLN и TyR проводили по следующей схеме: первичная иммунизация – внутривнутрибрюшинно, по 25 мкг белка в смеси (1 : 1) с полным адьювантом Фрейнда (объем смеси 100 мкл); вторичная – через 25 сут, внутривнутрибрюшинно, по 25 мкг белка в смеси с неполным адьювантом Фрейнда. Сыворотки забирали у животных на 7-е сут после повторной иммунизации и их иммунореактивность по отношению к различным материалам, содержащим VNTR-область MUC1 (синтетические пептиды, их конъюгаты с белками-носителями, рекомбинантный SAV-TR₂₂), оценивали с помощью ИФА.

ИФА анти-VNTR(MUC1)-сывороток и материалов, содержащих VNTR-область MUC1, проводили на полистирольных 96-луночных планшетах по стандартной методике [37, 38]. Синтетический пептид pMuc.1, его конъюгаты с белками носителями (pMuc.1-Cys-KLN, pMuc.1-Cys-TyR, SAV-Biot-аср-pMuc.1), а также собственно белки-носители наносили в лунки в PBS (0.01 М Na-фосфат, 0.15 М NaCl, pH 7.2) по 100 мкл в концентрации 20 (для pMuc.1) или 5 мкг/мл (для белков и их конъюгатов) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Карциномные клетки T47D иммобилизовали в лунках планшета высушиванием после внесения в лунки отмытой от культуральной среды клеточной суспензии в PBS (100 мкл, 5×10^5 клеток/мл). Затем для блокирования свободных участков в планшеты добавляли по 100 мкл 1% BSA-PBS и инкубировали 1 ч при 37°C. После отмывания (PBS, 3 раза по 200 мкл) добавляли 100 мкл сыворотки мышей в последовательных разведениях и инкубировали 1.5 ч при 37°C. Планшеты отмывали PBS, вносили кроличьи анти-(IgG мыши)-антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (разведение 1 : 2000), и вновь инкубировали 1.5 ч при 37°C. Планшеты трижды отмывали PBS, в лунки вносили по 100 мкл субстратной смеси (0.05% раствор *o*-фенилендиамина в 0.1 М Na-фосфат/0.05 М цитратном буфере, pH 5.0, содержащем 0.03% перекись водорода) и инкубировали при комнатной температуре. Фер-

ментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл 4 М серной кислоты. Оптическое поглощение измеряли при 492 нм на приборе Titertek Multiscan (Flow), используя параллельные определения для каждой точки ИФА.

Работа выполнялась в рамках Программы правительства Москвы "Разработка и внедрение в медицинскую практику новых методов диагностики и лечения онкологических заболеваний".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Finn O.J., Jerome K.R., Henderson R.A., Pecher G., Domenech N., Magarian-Blander J., Barratt-Boyes S.M. // Immunol. Reviews. 1995. V. 145. P. 61–88.
2. Apostolopoulos V., Lofthouse S.A., Popovski V., Chelvanayagam G., Sandrin M.S., McKenzie I.H.G. // Nature Biotechnology. 1998. V. 15. P. 276–280.
3. 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.
4. Apostolopoulos V., McKenzie I.F. // Crit. Rev. Immunol. 1994. V. 14(3-4). P. 293–309.
5. Lancaster C.A., Peat N., Duhig T., Wilson D., Taylor-Papadimitriou J., Gendler S.J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990. V. 173. P. 1019–1029.
6. Pratt W.S., Islam I., Swallow D.M. // Ann. Hum. Genet. 1996. V. 60. P. 21–28.
7. Magarian-Blander J., Ciborowski P., Hsia S., Watkins S.C., Finn O.J. // J. Immunol. 1998. V. 160. P. 3111–3120.
8. Ligtenberg M.J., Vos H.L., Gennissen A.M., Hilkens J. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 5573–5578.
9. Griffiths A.B., Burchell J., Genoler S., Lewis A., Blight K., Tilly R., Taylor-Papadimitriou J. // Int. J. Cancer. 1987. V. 40. P. 319–327.
10. Burchell J., Taylor-Papadimitriou J., Boshell M., Gendler S., Duhig T. // Int. J. Cancer. 1989. V. 44. P. 691–696.
11. Barnd D.L., Lan M.S., Metzgar R.S., Finn O.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 7159–7163.
12. Agarwal B., Reddish M.A., Longenecker B.M. // J. Immunol. 1996. V. 157. P. 2089–2095.
13. Jerome K.R., Domenech N., Finn O.J. // J. Immunol. 1993. V. 151. P. 1654–1662.
14. Apostolopoulos V., Chelvanayagam G., Xing P.-X., McKenzie I.F. // J. Immunol. 1998. V. 161. P. 767–775.
15. Apostolopoulos V., Pietersz G.A., Lovelend B.E., Sandrin M.S., McKenzie I.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 10128–10132.
16. Banchereau J., Steinman R.M. // Nature. 1998. V. 392. P. 245–252.
17. Pecher G., Finn O.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 1699–1704.
18. Gyllensten U. // PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification / Ed. H.A. Erlich. New York; London; Tokyo; Melbourne; Hong Kong: Stockton Press, 1989. P. 45–60.
19. Prince J.T., McGrath K.P., DiGirolamo C.M., Kaplan D.L. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 10879–10885.
20. Kam J.L., Regimbald L.H., Hilgers J.H.M., Hoffman P., Krantz M.J., Longenecker M., Hugh J.C. // Cancer Research. 1998. V. 58. P. 5577–5581.
21. Argarana C.E., Kuntz I.D., Birken S., Alex R., Cantor C.R. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. P. 1871–1882.
22. Weber P.C., Pantoliano M.W., Thompson L.D. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 9250–9254.
23. Olejnik J., Sonar S., Krzymanska-Olejnik E., Rothschild K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 7590–7594.
24. Sano T., Vajda S., Cantor C. // J. Chromatography B. 1998. V. 715. P. 85–91.
25. Гулько Л.Б., Дьяков Н.А., Окороква Н.А., Вейко В.П., Дебабов В.Г. // Биотехнология. 1999. № 4. С. 3–8.
26. Дьяков Н.А., Гулько Л.Б., Окороква Н.А., Вейко В.П. // 9th European Congress on Biotechnology. 1999. ECB9/2804.
27. Вейко В.П., Гулько Л.Б., Окороква Н.А., Дьяков Н.А., Дебабов В.Г. // Биооргани. химия. 1999. Т. 25. С. 185–189.
28. Wei R.D. // Methods Enzymol. 1970. V. 18A. P. 424–427.
29. Lloyd K.D., Burchell J., Kudryashov V., Yin B.W., Taylor-Papadimitriou J. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 33325–33334.
30. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. P. 1.22; 1.53; 1.74; 17.32.
31. Вейко В.П., Ратманова К.И., Осипов А.С., Буленков М.Т., Пугачев В.В. // Биооргани. химия. 1991. Т. 17. С. 625–629.
32. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // J. Mol. Biol. 1975. V. 94. P. 441–446.
33. Вейко В.П., Осипов А.С., Шехтер И.И., Буленков М.Т., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Чибискова Н.А., Эррайс Л.Л., Деревицкова Е.Б., Дебабов В.Г. // Биооргани. химия. 1995. Т. 21. С. 354–358.
34. Laemmli U. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
35. Hofmann K., Wood S.W., Brinton C.C., Montibeller J.A., Finn M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 4666–4668.
36. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248.
37. Tijssen P. // Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology / Ed. R.H. Burdon, P.H. van Knippenberg. Amsterdam: Elsevier, 1986. V. 15. P. 258–270.
38. Ионов Ю.В., Юрин В.Л. // Иммунология. 1992. Т. 4. С. 57–60.

Construction of a Gene of the Human Tumor-associated Antigen VNTR(MUC1) Bound to Streptavidin, Its Expression in *Escherichia coli*, and the Study of Properties of the Hybrid Protein

L. B. Gul'ko, O. V. Pavlova, N. A. D'yakov, N. A. Okorokova, K. I. Ratmanova, N. N. Logunova, R. A. Bobreneva, V. A. Makarov, V. L. Yurin, V. P. Veiko[#], and V. G. Debabov

State Research Center of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the Russian Federation, Pervyi Dorozhnyi proezd 1, Moscow, 113545 Russia

A gene of human tumor-associated antigen VNTR(MUC1) bound to streptavidin, an expression plasmid, and a highly effective hybrid protein-producing strain were constructed. It was shown that the streptavidin leader peptide ensures an effective secretion of the hybrid protein into the periplasmic space of *Escherichia coli* cells. The hybrid protein was isolated in a homogeneous state and its immunogenic properties were studied.

Key words: Escherichia coli, hybrid protein, MUC1, streptavidin, tumor-associated antigen, VNTR

[#] *To whom correspondence should be addressed; phone +7 (095) 314-8173 or +7 (095) 394-8114; e-mail: veiko@genetika.ru.*

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 6. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.