

УДК: 616-006.66:557-29

КАРТИРОВАНИЕ ЭПИТОПА НА БЕЛКЕ ERBB-2, УЗНАВАЕМОГО МОНОКЛОНАЛЬНЫМ АНТИТЕЛОМ 4B8, С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ

М.Б. Боргоякова^{1,2}, А.А. Ильичев^{1,2}

*ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская обл.¹,
Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск²
630559, Новосибирская обл., п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»,
e-mail: duker@vector.nsc.ru¹*

Представлены результаты идентификации и локализации эпитопа в составе белка ErbB-2, с которым связывается моноклональное антитело 4B8, предназначенное для использования при проведении иммуногистохимического анализа с целью оценки уровня продукции белка ErbB-2. Эпитоп был идентифицирован с помощью биопеннинга фаговой пептидной библиотеки на основе нитчатого фага, его локализация выявлена с помощью программы ClustalW, анализ специфичности произведен с помощью иммуноферментного анализа. Полученный эпитоп также оказался схож с последовательностью, расположенной в тирозинкиназном домене рецептора, что говорит о возможном взаимодействии данного участка с МКА 4B8.

Ключевые слова: ErbB-2, фаговый дисплей, картирование эпитопа.

MAPPING OF AN EPITOPE OF ERBB-2 FOR RECOGNIZING BY MONOCLONAL ANTIBODY 4B8 USING PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY

M.B. Borgoyakova^{1,2}, A.A. Ilichev^{1,2}

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Novosibirsk region, Koltsovo¹

Novosibirsk State University, Novosibirsk²

Koltsovo-630559, Novosibirsk region, Russia, State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR

e-mail: duker@vector.nsc.ru¹

This article presents identification and mapping of an epitope in the protein ErbB-2 which binds to the monoclonal antibody 4B8 intended for use in immunochemistry to estimate the level of ErbB-2 production. Epitope was identified by biopanning of phage display library based on filamentous phage. Location of the epitope was revealed in ClustalW program, analysis of specificity was carried out by ELISA. The epitope is also similar to the sequence on tyrosine kinase domain. It suggests a possible interaction of this site with 4B8.

Key words: ErbB-2, phage display, epitope mapping.

Белок ErbB-2 (HER-2, neu, p185) – член семейства тирозинкиназных рецепторов эпидермального фактора роста (ЭФР), которое включает ещё 3 рецептора (EGFR, ErbB-3 и -4) [5]. Они обладают сходной структурой, имеют общие лиганды и играют большую роль в процессах развития и дифференцировки тканей эпителиального, мезенхимального и нейрального происхождения [3]. Неактивные тирозинкиназные рецепторы ЭФР находятся в «закрытом» состоянии, после связывания с лигандом их конформация меняется, они димеризуются и в результате аутофосфорилирования

запускают каскад реакций митогенного характера. ErbB-2 отличается от остальных членов семейства отсутствием необходимости в лиганде и, соответственно, находится в постоянно «открытой» конформации [4, 7].

За счёт спонтанной полисомии 17-й хромосомы или амплификации гена, кодирующего белок ErbB-2, происходит гиперпродукция последнего, что приводит к его спонтанной активации. Запускаемый неконтролируемый каскад реакций вызывает гиперплазию ткани с последующей малигнизацией [1, 11].

Для эффективного иммунотерапевтического лечения рака молочной железы (РМЖ) необходимо предварительно оценить уровень продукции белка HER-2 (HER-2 статус) в каждом конкретном случае, так как принято считать, что гиперпродукция этого рецептора связана с более агрессивным течением заболевания. С этой целью в первую очередь проводят дешёвый иммуногистохимический анализ (ИГХ) опухолевой ткани с использованием поли- или моноклональных антител. Поскольку оценка зависит от выбранного антитела, метода фиксации и приготовления срезов, а также способа интерпретации полученной информации, результат получается довольно грубым [10]. В случае, когда ИГХ анализ не позволяет с достаточной точностью оценить HER-2-статус пациента, исследуют уровень амплификации гена *c-Erb-2* с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ*. Соответственно полученной информации о наличии гиперпродукции белка ErbB-2 назначают определённые схемы терапии. Этот подход является более точным, но и более дорогостоящим и трудоёмким [9].

Как было указано выше, первичная оценка HER-2-статуса производится с использованием различных антител. Исследуемое моноклональное антитело (МКАТ) 4B8, используемое для ИГХ, связывается с N-концом белка ErbB-2. Технология фагового дисплея в настоящее время является наиболее простым подходом к изучению белок-белковых взаимодействий, в том числе взаимодействия антиген-антитело. Нитчатые бактериофаги не имеют тропности к тканям млекопитающих, поэтому взаимодействие мишени с фагами из комбинаторной библиотеки обеспечивается исключительно за счет пептидных встроок. Последовательность такой встройки легко определить секвенированием, поскольку у нитчатых фагов существует прямая физическая связь между генотипом и фенотипом.

Целью исследования являлись картирование эпитопа, к которому специфично моноклональное антитело 4B8, с помощью биопенинга фаговой пептидной библиотеки и проверка специфичности связывания отобранных мимотопов в ИФА.

Материал и методы

Антитела. Моноклональные антитела производства фирмы Abnova, использованные в данной работе, были получены с помощью гибридомной технологии. Клон 4B8 был отобран после иммунизации мышей синтетическим пептидом, яв-

ляющимся полным гомологом участка 22-122 а.о. человеческого ErbB-2. Для ИФА использовались анти-M13 антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (GE Healthcare).

Фаговая пептидная библиотека. В работе использовали штамм *Escherichia coli* ER2738 и фаговую пептидную библиотеку Ph.D.-7TM фирмы New England Biolabs, Inc. 7-мерная фаговая пептидная библиотека содержит все возможные варианты последовательностей пептидов, экспонированных на поверхности бактериофагов в составе минорного белка рIII. Каждый клон в библиотеке представлен ~1000 копий.

Среды и растворы. Использовали следующие среды: LB, 1,5 % агар, 0,6 % агар (на основе LB). Растворы: IPTG/Xgal, тетрациклина (методики приготовления описаны в инструкции к набору библиотеки), преципитирующий (20 % ПЭГ-6000, 2,5 М NaCl). Буферы: блокирующий (0,1 М NaHCO₃, pH 8,6, 0,5 % БСА, 0,02 % NaN₃), TBS (50 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl), йодный (10 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА, 4 М NaI).

Аффинная селекция пептидов, специфически взаимодействующих с МКАТ 4B8, проводилась по схеме, указанной в инструкции, с модификациями. Для проведения всех трёх раундов селекции в лунки иммунологических планшетов вносили по 100 мкл раствора МКА 4B8 в концентрации 29 мкг/мл в 0,1 М NaHCO₃ (pH 8,6) и продолжали сорбцию в течение ночи при 4°C. Для первого раунда использовали 10 лунок, для второго и третьего – по 1 лунке. Тщательно удалив раствор антитела из лунок, в них вносили блокирующий буфер для предотвращения неспецифической сорбции фагов на пластик, инкубировали в течение 1 ч при 4°C. Затем проводили шестикратную отмывку в TBS, содержащем 0,1 % Твин-20 (для 2-го и 3-го раундов использовался 0,5 % Твин-20), и добавляли в лунки по 100 мкл разведённой в TBST фаговой пептидной библиотеки (~10¹¹ БОЕ/мл). Инкубировали библиотеку в течение часа при комнатной температуре. Несвязавшиеся фаги удаляли, десятикратно промывая лунки TBS+Твин, а связавшиеся фаги элюировали по следующей методике: добавляли в каждую лунку по 100 мкл 0,2 М глицинового буфера с HCl (pH 2,2), 0,1 % БСА, через 10 мин нейтрализовали буфер 15 мкл 1 М Трис-HCl (pH 9,1). Для увеличения количества фагов элюат амплифицировали в 20 мл разведённой 1:100

ErbB-2 1-60	MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMLRLPASPEHLDMRLHLYQGCQVVGNL
immunogen	-----STQVCTGTDMLRLPASPEHLDMRLHLYQGCQVVGNL
10	-----TTDMKLR-----
12	-----TTDTKLR-----
11	-----ITDTKLR-----
15	-----ATDSKLR-----
21	-----YFDGKLR-----
01	-----YLDMKVR-----
29	-----GLDLKLR-----
23	-----VQDPKLR-----
27	-----HMDAKLR-----
19	-----IADFKLR-----
09	-----SPDAKMR-----
33	-----TTDVKMR-----
17	-----ITDYKMR-----
	* * *

Рис. 1. Часть выравнивания белка ErbB-2, иммуногена для наработки 4В8 и пептидов, отобранных в нашем исследовании с помощью фагового дисплея. Выравнивание осуществлялось на базе программы ClustalW

ночной культуры ER2738 в течение 4,5 ч на термощейкере при 37°C. Амплифицированный элюат очищали и использовали для следующего раунда. Элюат третьего раунда не амплифицировали. Для изоляции отдельных фагов его титровали на чувствительной культуре и переносили индивидуальные негативные колонии фаговых клонов в пробирки с 1 мл среды LB, содержащей разведенную 1:100 ночную культуру ER2738. Проводили раздельную амплификацию фаговых клонов в течение 4,5 ч на термощейкере при 37°C. Дважды центрифугировали и переносили по 500 мкл супернатанта в новые пробирки. Очищали фаговую ДНК с использованием йодного буфера.

Таблица

№ клона	Последовательность	Количество клонов
01	YLDMKVR	1
09	SPDAKMR	1
10	TTDMKLR	1
11	ITDTKLR	1
12	TTDTKLR	1
15	ATDSKLR	1
17	SVDWKLR	7
19	IADFKLR	1
21	YFDGKLR	12
23	VQDPKLR	1
27	HMDAKLR	1
29	GLDLKLR	1
33	TTDVKMR	1

Секвенирование ДНК потомков одного фагового клона для определения последовательностей встраек проводили на автоматическом капиллярном секвенаторе в ЦКП СО РАН «Геномика». Обработка результатов секвенирования производилась в программах Seaview, ClustalW.

Иммуноферментный анализ для оценки специфичности связывания отобранных фагов с иммобилизованным МКА 4В8 был выполнен на 96-луночных планшетах, лунки которых были покрыты антигеном в концентрации 2 мкг/мл после ночной инкубации при 4°C (для разведения использовался 0,1М NaHCO₃, pH 8,6). После инкубации с блокирующим буфером для уменьшения возможности неспецифического связывания и 6-кратной отмывки в TBST в лунки были добавлены фаговые клоны в концентрации 10¹⁰ БОЕ/мл, инкубация проводилась 1 ч при комнатной температуре. После отмывки были добавлены конъюгированные с пероксидазой анти-M13 антитела, разведенные 1:5000. Результат проявляли хромогеном ТМВ, регистрация сигнала проводилась при длине волны 450 нм. Было проведено четыре независимых ИФА.

Результаты и обсуждение

После трёх раундов аффинной селекции из неамплифицированного элюата последнего раунда были отобраны 30 фаговых клонов, в которых была определена последовательность встройки (таблица).

Все пептиды выравниваются, обнаруживая три консенсусных аминокислотных остатка (а.о.): D – аспарагиновая кислота, K – лизин, R – аргинин.

ErbB-2 951-1010	VYIMVWCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQMEDLGPA SP LDSTFYRSLL
10	-----TTDMKLR-----
12	-----TTDTKLR-----
11	-----ITDTKLR-----
19	-----IADFKLR-----
23	-----VQDPKLR-----
27	-----HMDAKLR-----
33	-----TTDVKMR-----
17	-----ITDYKMR-----
09	-----SPDAKMR-----
21	-----YFDGKLR-----
01	-----YLDMKVR-----
29	-----GLDLKLR-----
15	-----ATDSKLR-----
	: : *

Рис. 2. Взаимодействие отобранных фаговых клонов и фага mp9 на фоне бесфагового контроля (к).
На оси ординат указаны значения оптической плотности (OD 450)

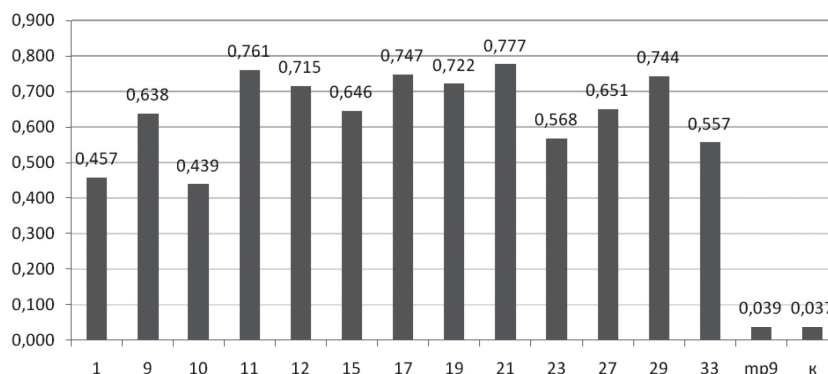


Рис. 3. Выравнивание участка тирозинкиназного домена и пептидов, отобранных в нашем исследовании, осуществлялось на базе программы ClustalW

Считается, что именно заряженные а.о. оказывают наибольшее влияние на связывание антител [6], поэтому кажется понятным, почему именно эти аминокислоты оказались в составе консенсусного мотива.

От производителя известно, что иммуноген, который использовали для наработки антитела 4B8, являлся синтетическим полипептидом, идентичным по аминокислотной последовательности участку 22–122 а.о. белка ErbB-2. Выравнивание полученных пептидов с иммуногеном и N-концом ErbB-2 позволило выявить локализацию указанных а.о. (рис. 1). Основываясь на этих результатах, с большой вероятностью мы можем предположить, что Asp-30, Lys-32, Arg-34 составляют линейный эпитоп, с которым связывается МКАТ 4B8. Стоит отметить также значимость а.о. в 33-й позиции: во всех клонах на этом месте расположены али-

фатические а.о., имеющие примерно одинаковый размер бокового радикала (Leu, Met, Val). По всей видимости, эта позиция также важна для связывания антитела.

Известно, что обнаруженный мотив в нативном ErbB-2 находится между β -складкой (25–27 а.о.) и α -спиралью (39–50 а.о.), то есть участок 30–34 а.о. имеет свободную конформацию и подходит для формирования эпитопа и взаимодействия с антителом (база данных Pubmed).

Результаты иммуноферментного анализа при наличии отрицательного контроля в виде фага mp9, не имеющего встройки, показывают высокую специфичность связывания отобранных фагов с исследуемым антителом (рис. 2).

Интересно, что полученный мотив в некоторой степени гомологичен участку, расположенному в тирозинкиназном домене ErbB-2 в позиции

964–968 а.о. (ECRPR). Аспарагиновая кислота на этом участке заменена на глутаминовую, а лизин – на аргинин (рис. 3).

Поскольку считается, что в этих парах (D-E, K-R) аминокислоты иммунологически тождественны в значительной степени, а аминокислота пролин (Р) является алифатической с небольшим боковым радикалом, есть вероятность, что МКАТ 4В8 связывается также и с указанным участком, то есть, возможно, позволяет выявить гиперпродукцию С-концевого фрагмента ErbB-2 (C-terminal fragment, CTF) [8]. Существуют данные, указывающие на значимость увеличения количества тирозинкиназного домена внутри клетки в развитии опухоли. Новообразования, характеризующиеся повышенной продукцией CTF, оказываются устойчивы к определённым видам терапии, поэтому важно во время анализа ткани РМЖ также выявить наличие в цитоплазме и/или ядре CTF [2]. Исследуемое нами антитело 4В8, вероятно, может позволить в некоторой степени оценить наличие данной аномалии в ходе первичного анализа HER-2 статуса.

Таким образом, впервые нами был идентифицирован и локализован линейный эпитоп рецептора HER-2, с которым связывается МКА 4В8. Он представляет собой последовательность DMKLR, в которой ключевые позиции для связывания антитела занимают заряженные аминокислотные остатки: аспарагиновая кислота, лизин и аргинин. Также была выявлена последовательность в составе тирозинкиназного домена, которая, вероятно, может связывать МКА 4В8, поскольку содержит иммунологически тождественные указанным аминокислотные остатки. Следует отметить, что полученные данные подтверждают возможность использования МКА 4В8 для оценки HER-2 ста-

туса, а также дают возможность предположить, что оно может быть использовано для оценки продукции CTF. Результаты данного исследования могут быть интересны разработчикам различных методов диагностики (ИФА, ИГХ и др.), а также могут быть использованы при разработке вакцин нового поколения, например полиэпитопных вакцин или вакцин на основе дендритных клеток, нагруженных антигенами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Akhdar A., Bronsard M., Lemieux R., Geha S. Détermination de l'amplification de l'oncogène *HER-2* dans le cancer du sein invasif par hybridation chromogénique in situ double couleur (dc-CISH): étude comparative avec l'hybridation fluorescente in situ (FISH) // *Ann. Pathol.* 2011. Vol. 31 (6). P. 472–479.
2. Anido J., Scaltriti M., Serra J. J. et al. Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation // *EMBO J.* 2006. Vol. 25 (13). P. 3234–3244.
3. Casalini P., Iorio M.V., Galmozzi E., Menard S. Role of HER receptors family in development and differentiation // *J. Cell Physiol.* 2004. Vol. 200 (3). P. 343–350.
4. Cho H.S., Mason K., Ramyar K.X. et al. Structure of the extracellular region of HER-2 alone and in complex with the Herceptin Fab // *Nature.* 2003. Vol. 421 (6924). P. 756–760.
5. Fuller S.J., Sivarajah K., Suqden P.H. ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium // *J. Mol. Cell Cardiol.* 2008. Vol. 44 (5). P. 831–854.
6. Maksyutov A.Z., Bachinskii A.G., Bazhan S.I. et al. Exclusion of HIV epitopes shared with human proteins is prerequisite for designing safer AIDS vaccines // *J. Clin. Virol.* 2004. Vol. 31, Suppl. 1. P. 26–38.
7. Normanno N., De Luca A., Bianco C. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer // *Gene.* 2006. Vol. 366 (1). P. 2–16.
8. Parra-Palau J. L., Pedersen K., Peg V. et al. A major role of p95/611-CTF, a carboxy-terminal fragment of HER-2, in the down-modulation of the estrogen receptor in HER2-positive breast cancers // *Cancer Res.* 2010. Vol. 70 (21). P. 8537–8546.
9. Sui W., Ou M., Chen J. et al. Comparison of immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridisation (FISH) assessment for Her-2 status in breast cancer // *World J. Surg. Oncol.* 2009. Vol. 7. P. 83.
10. Wang S., Saboorian M. H., Frenkel E. et al. Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridization assays // *J. Clin. Pathol.* 2000. Vol. 53 (5). P. 374–381.
11. Zhan N., Dong W.G., Tang Y.F. et al. Analysis of HER2 gene amplification and protein expression in esophageal squamous cell carcinoma // *Med. Oncol.* 2012. Vol. 29 (2). P. 933–940.

Поступила 19.03.13