

of the internal iliac artery (IIA) and both arteries were affected in 8.3 % of the patients. IMA after elective AAA repair was ligated in 130 patients, 65 patients had it implanted into prosthesis and 2 patients underwent stenting of the aorta. The operation resulted in preserved antegrade and retrograde blood flow in the IIA in a quarter (25.4 %) and a third (32.1 %) of the patients, respectively. In the early postoperative period ischemic colitis was found in 8 patients (4.1 %), and more than a third of them (37.5 %) developed infarction in the left side of the colon with a lethal outcome. To objectify the intraoperative assessment of the blood supply in the left colon

after elective AAA repair the methods of direct manometry and ultrasonography were used in 41 and 40 patients, respectively, and both methods were applied in 21 patients. The level of statistical significance and the positive values of the coefficients of correlation between the values of the peak systolic velocity and the indices of pressure intraoperative ultrasonography as a reliable and non-invasive method for assessing perfusion in the left side of the colon after electively AAA repair.

Key words: abdominal aortic aneurysm, left side of the colon, intraoperative assessment of the blood supply.

© Коллектив авторов, 2013 г.
УДК 576.8:612.815.1

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

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ЭКСТРАКЛЕТОЧНОГО ДОМЕНА РЕЦЕПТОРА HER2 В БАКТЕРИЯХ

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И. П. Павлова

ВВЕДЕНИЕ

Значительная часть онкологических заболеваний, включающих 30 % случаев рака молочной железы, сопровождается гиперэкспрессией рецептора-2 эпидермального ростового фактора человека (HER2/неу, с-erbB2) [1, 6]. При этом высокий уровень экспрессии белка характерен для рецидивирующих форм рака с плохим прогнозом [6]. Поскольку для лечения HER2-позитивных заболеваний достаточно эффективной является терапия на основе таких таргетных препаратов, как герцептин («Трастузумаб»), иммунодиагностика HER2-статуса опухоли имеет большое значение для успешной борьбы с заболеванием. В последнее время все больше внимания уделяется выявлению белка в сыворотке больных пациентов, представленного его экстраклеточным доменом (ECD) [3].

Для получения диагностических антител, анализа титра антител в сыворотке пациентов и создания таргетных препаратов нового поколения необходимо получение значительных количеств ECD HER2 в очищенном виде [4]. Нарботка ECD белка HER2 в бактериях *E. coli* имеет ряд преимуществ по сравнению с использованием эукариотических систем экспрессии. Существенным недостатком экспрессии ECD HER2 в клетках *E. coli* является накопление рекомбинантного продукта в виде не-

растворимых белковых включений. В частности, использование векторов pGEX-6P-1 и pQE30 для гетерологичной экспрессии структурного гена белка ECD HER2, содержащего сигнальный пептид, позволило получить рекомбинантные белки, слитые, соответственно, с N-концевыми глутатион-S-трансферазой и последовательностью, состоящей из 6 остатков гистидина (*polyHis*). При этом в обоих случаях продукты экспрессии образовывали в бактериальных клетках нерастворимые включения, которые легко солюбилизировались в присутствии 8М мочевины [10]. Для белка, слитого с глутатион-S-трансферазой, была разработана эффективная схема рефолдинга. В случае рекомбинантного продукта, несущего N-концевую последовательность *polyHis*, очистка в денатурирующих условиях (в присутствии 8М мочевины) и последующий рефолдинг оказались не столь эффективны и подробно нами не описаны.

В работе в бактериях *E. coli* был экспрессирован белок ECD HER2, содержащий N-концевую *polyHis*-последовательность, но не содержащий сигнальный пептид. Эффективная экспрессия белка была осуществлена с использованием вектора pRSET (*Invitrogen*, США) под контролем высокоактивного промотора бактериофага T7. Как и в описанных выше экспериментах, практически весь рекомбинантный продукт накапливался в бактериях в виде нерастворимых белковых включений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве источника мРНК использован патоморфологический материал фрагмента удаленной части молочной железы. Замороженную ткань растирали в жидком азоте и суммарную РНК выделяли с помощью реагента PureZOL™ (*Bio-Rad*, США) согласно инструкции производителя. Синтез кДНК проводили с использованием суммарной РНК в качестве матрицы. Для проведения одной реакции синтеза использовали 2,5 мкг РНК. Синтез проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 10 мМ Трис-НСl, рН 8,8, 50 мМ КСl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ дезоксинуклеотидтрифосфатов

(дНТФ), 100 пМ олиго(дТ) и гексануклеотидных праймеров, 1 ед. ингибитора рибонуклеаз и 200 ед. обратной транскриптазы M-MLV (*Fermentas*, Литва) в течение 1 ч при 42 °С. Перед началом реакции водный раствор, содержащий РНК и праймер олиго(дТ), прогревали в течение 5 мин при 65 °С. После завершения реакции синтеза для инактивации обратной транскриптазы смесь прогревали 1 мин при 95 °С. Пробы разводили водой до конечного объема 100 мкл. Для проведения ПЦР использовали 2 мкл раствора кДНК.

ПЦР проводили в смеси, содержащей кДНК, 67 мМ Трис-НСl (рН 8,6), 2,5 мМ MgCl₂, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,5 мМ каждого дНТФ, 10 пмоль прямого праймера 5' АСГАСТСГАГАСССААГТГТГСА ССГГСАСАГАС 3' и обратного праймера 5' GCAT GGTACСТТАСГТСАГАГГГСТГГСТСТСТГСТС 3'* и 2,5 Е *Taq* ДНК полимеразы («Силекс», Россия). Матрицу денатурировали 3 мин при 94 °С и ДНК амплифицировали в течении 30 циклов, включающих денатурацию (94 °С, 30 с), отжиг (58 °С, 30 с) и синтез (72 °С, 2 мин).

Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в агарозе. Фрагменты ДНК соответствующего размера выделяли из геля с помощью технологии GENECLEAN® [11]. Очищенный фрагмент встраивали в вектор pAL-TA («Евроген», Россия) с помощью T4 ДНК-лигазы (*Fermentas*, Литва). Смесь после лигирования использовали для трансформации бактерий *E. coli* (штамм DH5α) химическим методом. Бактерии высевали на твердую среду LB, содержащую ампициллин (100 мкг/мл), а также 0,1 мМ ИПТГ (изопрпил-β-D-тиогалактопиранозид) и 40 мкг/мл реагента X-Gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактозид) для отбора колоний белого цвета, несущих плазмиду со встроенным фрагментом. Плазмидную ДНК из бактерий выделяли методом щелочного лизиса с последующими обработкой РНКазой А, экстракцией фенолом, хлороформом (2 раза) и переосаждением в присутствии этилового спирта. Очищенную плазмиду использовали для рестрикционного анализа.

Клонированный фрагмент встраивали в вектор pRSETa (*Invitrogen*, США) по сайтам ферментов *XhoI* и *KpnI* с сохранением рамки считывания. Полученная конструкция была проверена с помощью секвенирования около 900 нуклеотидов ниже промотора T7, встроенного в вектор pRSET. Экспрессию осуществляли в С41 и С43 штаммах *E. coli*, являющихся производными бактериального штамма BL21(DE3) [7]. Свежие колонии бактерий, трансформированных полученной конструкцией, инокулировали в среду LB, содержащую ампициллин (100 мкг/мл) и инкубировали в течение ночи при

37 °С без добавления или с добавлением ИПТГ в качестве индуктора экспрессии. В последнем случае культуру растили до оптической плотности 0,6 ОЕ (измерение при длине волны 600 нм) и добавляли в среду 1 мМ ИПТГ (конечная концентрация). Бактерий осаждали центрифугированием при 3000g 10 мин, отмывали дистиллированной водой и разрушали ультразвуком в 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 8,0). Полученный гомогенат центрифугировали при 14 000 g 10 мин и содержание продукта анализировали в супернатанте и осадке с помощью иммуноблоттинга и антител, специфичных к полигистидиновой последовательности (*polyHis*), входящей в состав рекомбинантного белка. Белковые включения осаждали при 1500 g 10 мин, тщательно отмывали в 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 8,0) и хранили в виде замороженных осадков при -80 °С. Рекомбинантный белок растворяли в присутствии 8 М мочевины по методу, разработанному китайскими коллегами [10]. Количество солюбилизованного белка измеряли по методу Брэдфорд [2].

Электрофорез белков в 12%-м полиакриламидном геле осуществляли по методу Лэммли [8]. Для иммуноблоттинга белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с последующей блокировкой час в присутствии буфера ТТБС (50 мМ Трис-НСl (рН 7,4), 150 мМ NaCl, 0,05 % Tween-20), 1 % БСА. Мембрану инкубировали с разбавленными тем же раствором 1:3000 анти-*polyHis* антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (*Sigma-Aldrich*, США) в течение ночи при 4 °С. После отмывки в буферах ТТБС, и затем в ТБС (ТТБС буфер без твина), мембрану инкубировали в свежеприготовленном растворе для проявления пероксидазной реакции содержащем ТБС, 15 %-й метанол, 0,05 % 4-хлоро-1-нафтол (*Sigma-Aldrich*, США), 0,02 % H₂O₂.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В состав рецептора HER2, состоящего из 1256 аминокислотных остатков (138 кДа), входят сигнальный пептид, экстраклеточный, трансмембранный и внутриклеточный домены [11]. Поскольку для нашего исследования интерес представлял именно экстраклеточный домен рецептора, экспонированный на поверхности клетки, мы осуществили его экспрессию, начиная с 23-го аминокислотного остатка, удалив тем самым N-концевой сигнальный пептид, ответственный за поступление белка в секреторный путь.

Для амплификации последовательности, кодирующей ECD HER2, синтез кДНК осуществляли с использованием РНК, выделенной из патоморфологического материала, представляющего фраг-

* Подчеркиванием обозначены сайты рестрикции *XhoI* и *KpnI* соответственно, жирным шрифтом выделен стоп-кодон в составе обратного праймера.

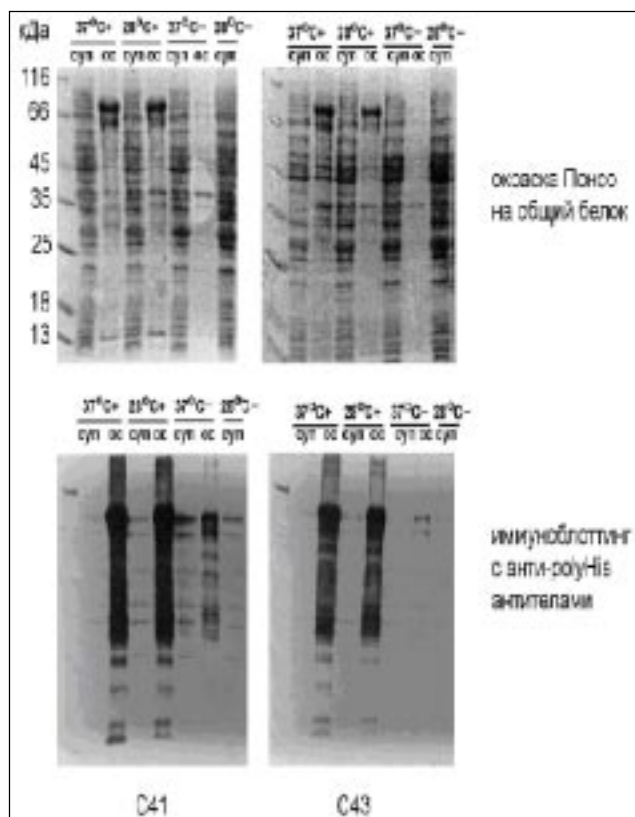
мент удаленной части молочной железы. ПЦР с использованием Taq-полимеразы позволил амплифицировать фрагмент ДНК соответствующего размера (1890 пн) и клонировать его в векторе pAL-TA. При обработке плазмиды со встроенной последовательностью рестриктазой *EcoRI* наблюдалось вырезание клонированной ДНК из состава вектора по сайтам *EcoRI* в составе полилинкера вектора, а также ее расщепление на два фрагмента размером около 1230 и 660 пн. Данный результат полностью согласуется с наличием внутреннего *EcoRI* сайта в составе гена HER2. Напротив, обработка плазмиды ферментами *XhoI* и *KpnI*, чьи сайты отсутствуют в составе фрагмента, но добавлены к праймерам, приводит к вырезанию полноразмерного клонированного фрагмента размером около 1900 пн. Дополнительным доказательством того, что нам удалось амплифицировать нужную последовательность, послужил результат расщепления плазмиды с помощью ферментов *XhoI* и *BamHI*.

Поскольку в клонированной последовательности в позиции 859 присутствует сайт *BamHI*, вырезание данным сочетанием ферментов фрагмента размером около 860 пн свидетельствует о совпадении расположения сайтов рестрикции в клонированном ПЦР-продукте и последовательности, кодирующей HER2.

На следующем этапе исследования клонированная последовательность была встроена в вектор pRSETa, созданный для наработки белков в бактериях под контролем РНК-полимеразы фага T7. Полученную конструкцию использовали для трансформации C41- и C43-штаммов *E. coli*, являющихся производными штамма BL21 (DE3) и созданными для эффективной наработки рекомбинантных белков [7]. При этом в случае штамма C41 наблюдалось токсичное воздействие чужеродного белка на рост бактерий. Несмотря на то, что на чашках с твердой средой LB и ампицилином вырастали колонии нормального размера, при добавлении в среду индуктора экспрессии ИПТГ развития колоний не наблюдалось. В случае трансформации плазмиды в клетки C43 токсичного эффекта в присутствии ИПТГ не наблюдалось.

Как показал анализ бактериальных белков с помощью ДСН-ПАГЭ и иммуноблоттинга с анти-*polyHis* антителами (последовательность из 6 остатков гистидина добавляется к рекомбинантному белку из состава вектора), наиболее эффективная экспрессия рекомбинантных белков наблюдалась при инокуляции свежих колоний в жидкую среду и культивировании в течение ночи при 37 °С после добавления в среду индуктора экспрессии ИПТГ. При этом в штамме C41 зарегистрировано накопление значительно большего количества рекомбинантного белка по сравнению со штаммом C43 (рисунок). Как видно из рисунка, практически весь рекомбинантный продукт накапливался в бактериальных центрифужных осадках в виде нерастворимых белковых включений.

Молекулярный вес рекомбинантного белка, оцененный с помощью ДСН-ПАГЭ, составил около 73 кДа, что полностью соответствует размеру, предсказанному согласно кодирующей последовательности (69 кДа) с поправкой на N-терминальный дополнительный пептид, кодируемый последовательностью в составе вектора (4 кДа). Полное соответствие размера предсказанного и экспрессированного белков еще раз доказало, что мы действительно клонировали последовательность, кодирующую экстраклеточный домен рецептора HER2 человека. Окончательное подтверждение этого было получено в результате определения нуклеотидной последовательности (секвенирования) первых 900 пн в составе клонированного фрагмента. При этом наблюдалась 100 %-я гомология последовательности с данными,



Анализ экспрессии экстраклеточного домена белка HER2 в двух штаммах бактерий *E. coli* (C41 и C43) при температурах 28 и 37 °С, а также в присутствии (+) и отсутствии (-) специфичного индуктора экспрессии ИПТГ. Разрушенные ультразвуком в 50мМ Трис-Cl (8,0) буфере бактерии центрифугировали при 14 000 г в течение 10 мин и супернатанты (суп), а также ресуспендированные в том же буфере до объема супернатанта осадки (ос) разделяли в 12 %-м геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и либо окрашивали Понсо на общий белок, либо инкубировали с анти-*polyHis* антителами

полученными из банка генетической информации Национального центра биотехнологической информации США (NCBI).

Для оценки количества нарабатываемого белка из нерастворимых включений была повторена схема солюбилизации, описанная в работе китайских коллег [10]. В данной публикации сообщалось, что отмывка белковых включений в присутствии 2 %-го дезоксихолата натрия и солюбилизация в 10 мМ Трис-Cl, 0.1 мМ NaH₂PO₄, 8 мМ мочеvine и 5 мМ дитиотреитолу (рН 8,0) приводила к солюбилизации рекомбинантного белка. Соблюдение описанной процедуры позволило получить до 15 мг солюбилизованного в мочеvine белка из 1 литра бактериальной культуры.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ № 12-08-01086-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Adv. Exp. Med. Biol. — 2007. — Vol. 608. — P. 119–129.
2. Anal. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.
3. Anticancer Res. — 2004. — Vol. 24. — P. 1261–1266.
4. Cancer Immunol. Immunother. — 2006. — Vol. 55 (9). — P. 1091–1099.
5. Clin. Cancer Res. — 2002. — Vol. 8. — P. 520–525.
6. Int. J. Gynaecol. Obstet. — 2008. — Vol. 102 (2). — P. 128–131.
7. J. Mol. Biol. — 1996. — Vol. 260. — P. 289–298.
8. Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.
9. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1979. — Vol. 76 (2). — P. 615–619.
10. Protein Expr. Purif. — 2006. — Vol. 53 (2). — P. 247–254.
11. Science. — 1985. — Vol. 230. — P. 1132–1139.

РЕЗЮМЕ

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

Гетерологичная экспрессия экстраклеточного домена рецептора HER2 в бактериях

Рецептор эпидермального ростового фактора человека (HER2/neu, c-ErbB2) представляет собой протоонкогенный белок и экспрессируется при ряде онкологических заболеваний, включающих 30 % случаев рака молочной железы, а также опухоли яичника, желудка и других органов. Получение значительных количеств экстраклеточного домена ECD HER2 в очищенном виде остается весьма актуальной задачей для иммунодиагностики и терапии. Клонирована последовательность, кодирующая экстраклеточный домен рецептора HER2 человека, и осуществлена эффективная наработка рекомбинантного белка в бактериях *E. coli*.

Ключевые слова: рецептор эпидермального фактора роста, экстраклеточный домен, бактериальная экспрессия.

SUMMARY

V. V. Dolgikh, I. V. Senderskiy, G. V. Tetz, V. V. Tetz

Extracellular domain of HER2 heterologous expression in bacteria

Human epidermal growth factor receptor (HER2/neu, c-ErbB2) is a proto-oncogene protein which is overexpressed in some oncological diseases including 30 % of breast cancers, tumors in the ovary, stomach and other organs of the human body as well. Since Her2-tumor status testing is the essential part of successful cancer treatment, expression and purification of substantial amounts of the extracellular domain of the ECD HER2 is an important task. In this work sequence encoding HER2 extracellular domain was cloned and expressed in *E. coli*.

Key words: epidermal growth factor receptor, extracellular domain, bacterial expression, refolding.

© Коллектив авторов, 2013 г.
УДК [616.831-006.484:616.831.31-009.24]-097.3

**В. Н. Очколяс, А. Ф. Гурчин,
А. А. Скоромец, А. В. Костюкевич**

ЭПИЛЕПТИЧЕСКИЙ СИНДРОМ В КЛИНИЧЕСКОЙ КАРТИНЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И УРОВЕНЬ АУТОАНТИТЕЛ К GluR1-СУБЪ- ЕДИНИЦЕ АМРА-РЕЦЕПТОРОВ ГЛЮТАМАТА У БОЛЬНЫХ ГЛИО- МАМИ ПОЛУШАРИЙ БОЛЬ- ШОГО МОЗГА

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова; Институт мозга человека имени Н. П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург

Несмотря на значительные успехи в изучении эпилептогенеза за последнее десятилетие, теоретический и практический интерес к изучению клеточно-молекулярных механизмов развития симптоматической эпилепсии не ослабевает. Большую роль в клеточно-молекулярных механизмах эпилептогенеза играют АМРА (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) ионотропные глутаматные рецепторы. Через рецепторы и сопряженные с ними ионные каналы натрия и кальция реализуется ионотропный эффект глутамата, являющегося наиболее распространенным возбуждающим нейротрансмиттером нервной системы [1, 2, 11]. При нарушениях физиологических механизмов выброса в синаптическую щель, транспорта и биохимической трансформации глутамата происходит активация и, при определенных патологических состояниях, последующая альтерация ионотропных глутаматных рецепторов. В этих условиях изменение тока ионов через сопряженные