

С. Сейфуллиннің 125 жылдығына арналған «Сейфуллин окулары – 15: Жастар, ғылым, технологиялар: жаңа идеялар мен перспективалар» атты халықаралық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Международной научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 15: Молодежь, наука, технологии - новые идеи и перспективы», приуроченной к 125 летию С. Сейфуллина. - 2019. - Т.1, Ч.1 - С.102-105

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА K167В КАЧЕСТВЕ ИММУНОГЕНА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ШТАММОВ ГИБРИДОМ – ПРОДУЦЕНТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ**

*Зауатбаева Г. М., Ескендирова С. З.,  
Боровиков С. Н.*

Среди множества разновидностей опухолевых заболеваний в мире основное место занимает рак молочной железы. В настоящее время существует множество методов характеристики и детекции опухолевых клеток в условиях *in vitro*. Оценка экспрессии генов является основным направлением, по которому врач-онколог определяет индивидуальное лечение для каждого больного. Так как, в зависимости от причины происхождения заболевания, раковые клетки могут иметь резистентность к определенным видам химиопрепаратов. Для категоризации раковых клеток на клетки низкого и высокого риска применяют многие онко-маркеры, одним из которых является Ki-67 [1].

Экономически выгодной и легкодоступной альтернативой анализа экспрессии генов может послужить иммуногистохимический метод характеристики опухолевых клеток, который может способствовать интеграции новых прогностических биомаркеров в клиническую медицину [2].

Биомаркер Ki-67 впервые был идентифицирован *Gerdes* его командой в 1983 году как ядерный негистоновый белок [3]. Отсутствие Ki-67 в нормальных клетках, и его значительная экспрессия в раковых новообразованиях вызвала бурный интерес среди исследователей. Позднее, с помощью уже существующих биомаркеров была подтверждена эта особенность и он стал известен как маркер пролиферации опухолевых клеток [4].

Ген Ki-67 локализован в длинном плече 10-й хромосомы. В настоящее время опубликована полная последовательность кДНК, а также альтернативных вида мРНК, которые в результате сплайсинга способны кодировать две изоформы белка Ki-67. Большая изоформа имеет молекулярную массу 359 кДа, а меньшая – 320 кДа. Существуют некоторые данные, полученные во время исследований мышей и человеческих клеточных линий, подтверждающие наличие гораздо большего количества вариантов сплайсинга, в результате которого могут появиться другие изоформы белка [5].

Маркер пролиферации Ki-67 отражает скорость пролиферации опухолевых клеток, которая коррелирует с прогрессированием и метастазированием злокачественных новообразований [6]. Ki-67 является регуляторным белком, который связан с ядерным клеточным циклом, и его экспрессия может быть обнаружена во время интерфазы в ядре опухолевых эпителиальных клеток. Особенность Ki-67 состоит в том, что он участвует во всех фазах клеточного роста (G1, S, G2 и митоз) и не участвует в фазе G0, делает его отличным инструментом для определения степени роста опухоли [7].

Несмотря на это точная роль антигена Ki-67 в регулировании клеточного цикла является неизвестной после многих лет исследований. Многие имеющиеся научные работы предоставляют различные вариации результатов [8,9,10], что показывает необходимость в дальнейшем и более глубоком изучении механизма работы маркера Ki-67.

Целью данной работы является проведение иммуногистохимического анализа моноклональных и поликлональных антител на основе маркера пролиферации опухолевых клеток Ki-67.

На основе анализа аминокислотной последовательности белка-биомаркера Ki-67 (GenBank, NCBI) и литературных данных определен фрагмент белка Ki-67, содержащий антигенную детерминанту протяженностью 334 аминокислотных остатка. Ген, кодирующий данный фрагмент белка Ki-67 был синтезирован и клонирован в составе экспрессионного бактериального вектора. Путем плазмидной экспрессии данного гена в клетках *E.coli* получен рекомбинантный аналог фрагмента белка Ki-67.

С целью наработки рекомбинантного пептида белка-биомаркера *Ki-67* в препаративном количестве проводили накопление биомассы культуры штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET28c/Ki67. Использование сильного индуцируемого промотора бактериофага T7 дало высокое внутриклеточное накопление рекомбинантного пептида белка-биомаркера *Ki-67* в *Escherichiacoli*. Благодаря полигистидиновой метке белок обладает высокой аффинностью к ионам Ni<sup>2+</sup>, фракционирование в градиенте имидазола позволило получить рекомбинантный белок *Ki-67* в большом препаративном количестве - 14 мг/мл. Данный показатель является очень высоким для белка, полученного методом плазмидной экспрессии генов в гетерологичном для них окружении.

Фракции рекомбинантного пептида белка-биомаркера *Ki-67* из водонерастворимых лизатов рекомбинантного штамма BL21(DE3)/pET28c/Ki67 методом металлоаффинной хроматографии обладают высокой электрофоретической степенью чистоты - 95%.

Для определения антигенной специфичности рекомбинантного белка *Ki67* с помощью непрямого варианта ИФА применяли гипериммунные антисыворотки, полученные иммунизацией беспородных мышей соответствующим антигеном. Используемая двухнедельная схема иммунизации мышей рекомбинантным белком *Ki67* обеспечила высокий

уровень выработки специфических антител против испытуемого антигена. Так, максимальная активность титров антител в сыворотках крови иммунизированных мышей достигала в среднем - 1: 682 666 (n=3), тогда как все сыворотки крови здоровых мышей показали отрицательный результат.

Специфичность взаимодействия испытуемого рекомбинантного антигена *Ki67* подтверждена использованием в качестве положительного контроля коммерческих МКА - *anti-Ki-67 B56 (BD Pharmingen)* и в качестве отрицательного контроля - МКА *anti-Human c-ErbB-2 (BD Pharmingen)*. Установлено, что не вступая в реакцию «антиген-антитело» с МКА *anti-Human c-ErbB-2*, рекомбинантный белок *Ki67* активно реагирует с МКА - *anti-Ki-67 B56* с предельным титром антител - 1:51200. Снижение специфической активности рекомбинантного антигена *Ki67* с МКА - *anti-Ki-67 B56* в сравнении с титрами сывороток крови иммунизированных мышей обусловлено значительно низким содержанием белка в исходном растворе коммерческих МКА - 0,5 мг/мл. Вместе с тем, аналогичное связывание сывороточных антител иммунных мышей и коммерческих МКА указывает на взаимодействие антител с идентичными эпитопами испытуемого рекомбинантного антигена *Ki67*.

Иммунохимическое проявление рекомбинантного антигена *Ki67* методом иммуноблотинга с использованием сыворотки крови иммунизированной мыши и коммерческого МКА - *anti-Ki-67 B56* подтвердило специфичность антител к эпитомам рекомбинантного белка *Ki67* с молекулярной массой 45 кДа.

Таким образом определена специфичность взаимодействия рекомбинантного белка *Ki67*, который в настоящее время использован нами в качестве иммуногена для получения штаммов гибридом – продуцентов моноклональных антител.

В дальнейших исследованиях будет проведена полная иммуногистохимическая характеристика моноклональных антител с помощью рекомбинантного белка *Ki-67*. Для этого будет использован метод флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием парафиновых срезов и отпечатков опухолей различной природы, которые будут обработаны биомаркером *Ki-67* в качестве ДНК-зонда. Аналитическая часть данного метода будет проведена с использованием флуоресцентного микроскопирования.

Ожидаемые результаты данного исследования предполагают использование моноклональных антител к маркеру пролиферации опухолевых клеток *Ki-67* в клинической диагностике для идентификации степени роста и развития злокачественных новообразований и дальнейшее применение его в качестве прогноза лечения опухолей. Оценка пролиферативной активности клеток на основе биомаркера *Ki-67* широко применяется в клинических целях при диагностике патологических процессов организма человека, в том числе злокачественных опухолей. Биомаркер *Ki-67* считается фактором неблагоприятного прогноза,

а его высокая экспрессия - показателем высокой метастатической способности опухоли.

### Список литературы

1. Shagufta Naeem, Shabana Naz, Anila Riyaz, Fouzia Jehangir, Naeema Afzal. Immunohistochemical analysis of breast cancer subtypes and their correlation with Ki 67 index // J Ayub Med Coll Abbottabad. – 2018. – Vol. 30. – P. 94-96.
2. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens // Nat Med. – 1998. – Vol.4. – P.844–847.
3. Gerdes J, Li L, Schlueter C, et al: Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67 //Am J Patholю – 1991. –Vol. 138. P. 867-873.
4. Dierendonck JH, Keijzer R, van de Velde CJ, et al: Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: Comparison with growth fraction in human breast cancer cells //Cancer Res. – 1989. –Vol.49. – P. 2999-3006.
5. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, et al: The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins //J Cell Biol. – 1993. Vol.123. – P.513-522.
6. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstadter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry //Breast Cancer Res Treat. – 2013. Vol.139(2). – P.539–552.
7. Scholzen T, Endl E, Wohlenberg C, van der Sar S, Cowell IG, Gerdes J, et al. The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure //J Pathol. – 2002. – Vol.196(2). – P.135–144.
8. P Jalava, T Kuopio, L Juntti-Patinen, T Kotkansalo, P Kronqvist and Y Collan. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index // Histopathology. – 2006. – Vol.48. – P.674-682.
9. Offersen BV, Sorensen FB, Knoop A et al. The prognostic relevance of estimates of proliferative activity in early breast cancer //Histopathology. – 2003. – Vol.43. – P.573-582.

10. Tan PH, Bay BH, Yip G et al. Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Mod. Pathol.* 2005; 18; 374–381.

11. Фридлянская И.И. Получение поликлональных антител //Методы культивирования клеток: Сб. науч. трудов, Л.: Наука.– 1988. –С.194-205.