

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 Ni²⁺, 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.