

УДК 577

## ОПТИМИЗАЦИЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ ЭКТОДОМЕНА РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЫ IRR

А. А. Можяев<sup>1,2,\*</sup>, А. Н. Орса<sup>1</sup>, И. Е. Деев<sup>1</sup>,  
академик РАН В. И. Швец<sup>3</sup>, А. Г. Петренко<sup>1</sup>

Поступило 01.12.2018 г.

Разработана методика оптимизации гетерологичной экспрессии эктодомена рецепторной тирозинкиназы IRR, позволившая в дальнейшем упростить выделение этого фермента, очистку и повысить конечный выход. Предложенный нами подход может найти применение в биотехнологическом производстве других рекомбинантных белков большого размера, производимых в медицинских целях.

*Ключевые слова:* рецептор, подобный рецептору инсулина, гетерологичная экспрессия, рецепторная тирозинкиназа.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524851110-113>

Рецепторные тирозинкиназы — важнейший компонент в системе передачи сигналов в клетке. Они играют ключевую роль в развитии и жизнедеятельности организма, участвуют в регуляции межклеточных взаимодействий, пролиферации и дифференцировке клеток, клеточной миграции и метаболизме, контроле клеточного цикла. Нарушения в работе данных рецепторов способны приводить к возникновению таких социально значимых заболеваний, как рак и диабет.

Рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR, Insulin Receptor-related Receptor), относится к мини-семейству рецепторов инсулина. В это мини-семейство помимо IRR также входят рецептор инсулина (IR, Insulin Receptor) и рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF-IR, Insulin-like Growth Factor 1 Receptor). Все три рецептора имеют высокоомологичные аминокислотные последовательности и одинаковые доменные структуры и, предположительно, схожие механизмы функционирования [1]. На сегодня известна пространственная структура внеклеточной части рецептора инсулина, а также кристаллизована часть внеклеточного домена рецептора инсулина вместе с инсулином [1, 2]. Имеются четыре разные модели активации рецепторов данного се-

мейства, и также остаётся не выясненным механизм аутофосфорилирования их внутриклеточных киназных частей.

Физиологическая роль IRR долго оставалась загадкой, так как с момента его открытия для него не было обнаружено ни одного эндогенного лиганда, несмотря на многочисленные попытки, включая полный анализ генома. В нашей лаборатории было впервые показано [3], что IRR является сенсором внеклеточной щелочной среды и принимает активное участие в поддержании кислотно-щелочного равновесия в организме. Мыши с нокаутом гена *IRR* имеют нарушения в поведении [4, 5]. Этот рецептор активируется при защелачивании внеклеточной среды при pH более 7,9, уровень активации, равный 50%, достигается при pH 8,5 и выходит на насыщение при pH более 9,0. Рецептор экспрессируется в отдельных клеточных популяциях почек, желудка и поджелудочной железы, где может контактировать с внеклеточными жидкостями [6]. С использованием химерных конструкций и точечного мутагенеза было установлено, что чувствительность IRR к pH определяется его внеклеточной частью (эктодоменом) [7–9]. Было показано [3, 10], что активация IRR приводит к фосфорилированию сигнальных внутриклеточных белков IRS-1 (Insulin Receptor Substrate 1) и Akt (Protein kinase B) и способствует перестройке цитоскелета клеток. Для изучения его структуры и функции нами были получены и охарактеризованы моноклональные антитела, специфично распознающие внеклеточную часть рецептора IRR [11].

Изучение структуры IRR, понимание особенностей его активации щёлочью и выяснение физиоло-

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии наук, Москва

<sup>2</sup> Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова Федерального научно-исследовательского центра “Кристаллография и фотоника” Российской Академии наук, Москва

<sup>3</sup> Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий)

\*E-mail: [a.a.mozhaev@gmail.com](mailto:a.a.mozhaev@gmail.com)

гической роли в организме представляют большой интерес и могут прояснить механизмы активации гомологичных рецепторных тирозинкиназ семейства рецепторов инсулина. Поскольку активация IRR определяется его внеклеточной частью (эктодоменом), выделение и изучение структуры эктодомена IRR необходимы для понимания фундаментальных основ механизма щёлочной чувствительности IRR и для разработки в будущем новых средств лечения заболеваний, обусловленных нарушением кислотно-щёлочного равновесия, клеточного деления и дифференцировки, в частности, некоторых форм рака.

Ключевым фактором для определения пространственной структуры чувствительного к рН эктодомена IRR при помощи рентгеноструктурного анализа является возможность получения с высокой степенью очистки рекомбинантного белка в количестве сотен миллиграммов.

Целью настоящей работы была оптимизация условий культивирования клеточной линии СНО-К1, экспрессирующей и секретирующей во внеклеточную среду эктодомен IRR.

**Конструирование экспрессионного вектора.** Для получения вектора экспрессирующего эктодомен IRR, кДНК, кодирующую эктодомен человеческого IRR, клонировали в вектор рЕЕ6.НСМV-GS (“Celltech Limited”, Великобритания). Вектор также содержал промотор цитомегаловируса человека для усиления уровня синтеза мРНК. Продуцируемый белок от N-к С-концу последовательно содержал лидерный пептид MAVPSLWPGACLPVIFLSLGFGLDTV для экспрессии эктодомена во внеклеточной среде (впоследствии отщеплялся), последовательность эктодомена IRR с 1 по 891 а.о., сайт расщепления энтерокиназы NDDDDK и Myc-Tag EQKLISEEDLN. Данный вектор основан на GS Gene Expression System® компании “Lonza” (Швейцария). Итоговый вектор обозначили как рЕЕ6.НСМV-GS-hIRR.

**Получение конститутивно экспрессирующей линии продуцента.** Для этого клеточную линию СНО-К1 (получена нами ранее [12]) трансфицировали вектором рЕЕ6.НСМV-GS-hIRR с использованием липофектина (Gibco®, “ThermoFisher Scientific”, США). При этом происходила интеграция целевого гена в генетический аппарат клетки-хозяина посредством гомологичной рекомбинации. Затем мы проводили селекцию клеточной линии СНО-К1 на среде GMEM с добавлением MSX (“Sigma-Aldrich”, США). Через 2–3 нед. после трансфекции проводили отбор клеток по уровню экспрессии эктодомена IRR, который оценивали с помощью иммуноферментного анализа.

**Культивирование СНО-К1.** Клетки выращивали на чашках Петри в селекционной среде DMEM, содержащей 10% диализованной эмбриональной сыворотки телёнка (dFBS, Gibco®, “ThermoFisher Scientific”), 1% пенициллина/стрептомицина, 1X GS добавка (“Sigma-Aldrich”), 40 мкМ MSX (“Sigma-Aldrich”), плазмоцин 40 мкл/л. Для масштабирования после достижения культурой монослоя через 2–3 дня роста клетки высевали на новые чашки, а затем на матрасы T175 (“Eppendorf”, Германия). Инкубацию проводили при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>.

**Электрофорез в ПААГ и Вестерн-блоттинг.** Электрофорез в 8%-м ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия с последующим Вестерн-блоттингом проводили по стандартному протоколу, как описано в [13, 14]. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану в течение 1,5 ч при 250 мА. Неспецифическую сорбцию белков предотвращали инкубацией мембраны в буфере TBST, содержащем 1% БСА, в течение 1 ч. Затем мембрану инкубировали с первичными антителами. Для идентификации выделенного белка использовали поликлональные кроличьи антитела против IRR. Данные антитела были получены против N-концевого фрагмента эктодомена мышинового IRR (539–686 а.о.) [3]. Далее мембрану отмывали от первичных антител и добавляли вторичные мышинные антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Полосы визуализировали после обработки люминесцентным субстратом SuperSignal™ West Pico PLUS (“ThermoFisher Scientific”) с помощью прибора FUSION Solo (“Vilber Lourmat”, Германия).

Для получения рекомбинантных рецепторов и их фрагментов применяют разные подходы и системы гетерологической экспрессии. В качестве первоначального подхода мы исследовали возможность получения внеклеточной части IRR в прокариотической системе (*E. coli*), но в дальнейшем выяснилось, что белок IRR в этих условиях не подвергается специфическому протеолизу. Та же ситуация повторилась с экспрессией в дрожжевой культуре *Pichia pastoris* и в клеточной линии насекомого *Spodoptera frugiperda*.

Применение системы экспрессии в клетках млекопитающих перспективно для получения белков эукариотического происхождения, так как позволяет сохранять нативную третичную структуру и посттрансляционные модификации. Особенные свойства нашего объекта исследования определили выбор продуцента — эукариотическая клеточная линия СНО-К1, в которой рецепторы из семейства рецепторов инсулина правильно процессируются при своей

экспрессии. Данная линия происходит из клеток яичника китайского хомячка и является адгезионной.

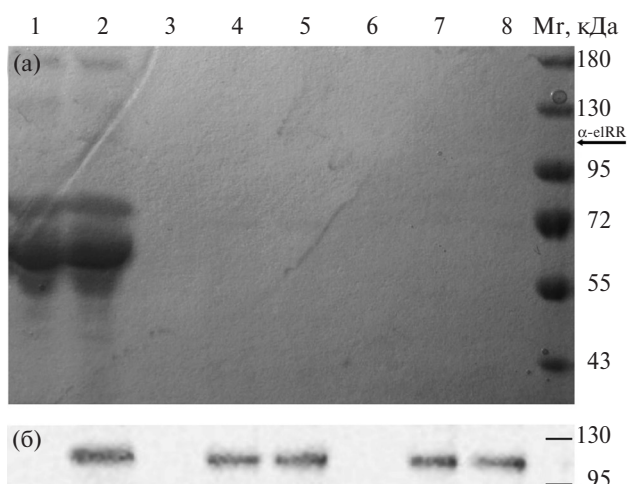
Первым этапом работ стало конструирование экспрессионного вектора и получение конститутивно экспрессирующей линии продуцента, как было описано выше. Согласно протоколу поставщика ("Lonza") с помощью экспрессионной системы Glutamine Synthetase Xceed Gene Expression мы получили линию клеток CHO-K1, конститутивно экспрессирующую и секретирующую во внеклеточную среду эктодомен IRR с С-концевым Мус-Тэг.

Предварительные эксперименты по выделению белка при росте клеток в среде с 10%-й FBS показали, что при относительно низком уровне экспрессии эктодомена IRR и значительном количестве других белков разработать эффективную систему очистки крайне сложно. Поэтому понадобилось провести оптимизацию состава питательной среды с целью снижения количества сыворотки в питательной среде. Для уменьшения количества других белков в исходном препарате при проведении процедуры очистки после достижения клетками монослоя культуральную среду заменяли на бессывороточные среды  $\alpha$ -MEM и RPMI с 1%-м пенициллином/стрептомицином, также варьировалось добавление L-глутамин.

Через 4 дня роста клеток отбирали культуральную среду с целевым белком и анализировали методами электрофореза в ПААГ и Вестерн-блоттинга (рис. 1). При замене среды уровень экспрессии целевого белка сохранился, но при этом значительно сократилось количество посторонних белков сыворотки (преимущественно БСА). При замене бессывороточной среды на новую порцию клетки сохраняли уровень конститутивной экспрессии эктодомена IRR в течение длительного времени при нормальной морфологии.

В результате комплексный подход по разработке системы экспрессии и подбор условий культивирования позволили достичь стабильного выхода (порядка 0,6 мг) эктодомена IRR с литра культуральной жидкости. Добавление L-глутамин в среду культивирования не оказало существенного влияния на уровень экспрессии эктодомена IRR. Данный подход позволил в дальнейшем упростить очистку целевого белка из среды и повысить его конечный выход.

Разработанный нами протокол производства рекомбинантного эктодомена IRR представляет интерес для масштабирования и использования в биотехнологических процессах, поскольку вместо дорогих коммерчески доступных бессывороточных сред, таких как, например, EX-CELL CD CHO Se-



**Рис. 1.** (а) — электрофореграмма образцов культуральных сред в денатурирующих условиях с добавлением  $\beta$ -меркаптоэтанола. Стрелкой отмечено местоположение  $\alpha$ -субъединицы эктодомена IRR ( $\alpha$ -eIRR). (б) — Вестерн-блот-окрашивание образцов культуральных сред. Окрашивание антителами против эктодомена IRR, с добавлением  $\beta$ -меркаптоэтанола. Мг, кДа, — маркер молекулярных масс. В качестве образцов культуральных сред использовали: (1) DMEM, 5% dFBS, 1X GS добавка, 40 мкМ MSX, плазмочин 40 мкл/л, (2) DMEM, 5% dFBS, 1X GS добавка, 40 мкМ MSX, плазмочин 40 мкл/л после 4 дней роста CHO-K1, (3)  $\alpha$ -MEM, (4)  $\alpha$ -MEM после 4 дней роста CHO-K1, (5)  $\alpha$ -MEM, 0,6 мг/мл L-глутамин после 4 дней роста CHO-K1, (6) RPMI, (7) RPMI после 4 дней роста CHO-K1, (8) RPMI, 0,6 мг/мл L-глутамин после 4 дней роста CHO-K1.

rum-Free Medium ("Sigma-Aldrich") используются значительно более дешёвые среды ( $\alpha$ -MEM и RPMI). При этом выход целевого белка остаётся на достаточно высоком уровне. Предложенный нами подход может найти применение в биотехнологическом производстве других рекомбинантных белков большого размера, производимых в медицинских целях.

**Источник финансирования.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда 14–50–00131.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McKern N.M., Lawrence M.C., Streltsov V.A., Lou M.Z., Adams T.E., Lovrecz G.O., Elleman T.C., Richards K.M., Bentley J.D., Pilling P.A., Hoyne P.A., Cartledge K.A., Pham T.M., Lewis J.L., Sankovich S.E., Stoichevska V., Silva E.D., Robinson C.P., Frenkel M.J., Sparrow L.G., Fernley R.T., Epa V.C., Ward C.W. // Nature. 2006. V. 443. P. 218–221.
2. Menting J.G., Whittaker J., Margetts M.B., Whittaker L.J., Kong G.K., Smith B.J., Watson C.J., Zatkova L., Kletvikova E., Jiracek J., Chan S.J., Steiner D.F., Dodson G.G., Brzozowski A.M.,

- Weiss M.A., Ward C.W., Lawrence M.C. // Nature. 2013. V. 493. P. 241–245.
3. Deyev I.E., Sohet F., Vassilenko K.P., Serova O.V., Popova N.V., Zozulya S.A., Burova E.B., Houillier P., Rzhovsky D.I., Berchatova A.A., Murashev A.N., Chugunov A.O., Efremov R.G., Nikol'sky N.N., Bertelli E., Eladari D., Petrenko A.G. // Cell Metab. 2011. V. 13. P. 679–689.
  4. Зубков Е.А., Морозова А.Ю., Чачина Н.А., Шаяхметова Д.М., Можжаев А.А., Деев И.Е., Чехонин В.П., Петренко А.Г. // ЖВНД. 2017. Т. 67. № 1. С. 106–112.
  5. Шаяхметова Д.М., Жевленев Е.С., Можжаев А.А., Деев И.Е., Петренко А.Г. // Биоорган. химия. 2016. Т. 42. № 4. С. 496–500.
  6. Petrenko A.G., Zozulya S.A., Deyev I.E., Eladari D. // Biochim. et Biophys. Acta. 2013. V. 1834. P. 2170–2175.
  7. Deyev I.E., Mitrofanova A.V., Zhevlenev E.S., Radionov N., Berchatova A.A., Popova N.V., Serova O.V., Petrenko A.G. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 33884–33893.
  8. Deyev I.E., Chachina N.A., Shayahmetova D.M., Serova O.V., Petrenko A.G. // Biochimie. 2015. V. 111. P. 1–9.
  9. Deyev I.E., Popova N.V., Petrenko A.G. // Acta Naturae. 2015. V. 7. P. 80–86.
  10. Deyev I.E., Popova N.V., Serova O.V., Zhenilo S.V., Regoli M., Bertelli E., Petrenko A.G. // Biochimie. 2017. V. 138. P. 62–69.
  11. Можжаев А.А., Ерохина Т.Н., Серова О.В., Деев И.Е., Петренко А.Г. // Биоорган. химия. 2017. Т. 43. № 6. С. 631–636.
  12. Cosgrove L., Lovrecz G.O., Verkuylen A., Cavaleri L., Black L.A., Bentley J.D., Howlett J.G., Gray P.P., Ward C.W., McKern N.M. // Protein Exp. Purif. 1995. V. 6. P. 789–798.
  13. Deyev I.E., Petrenko A.G. // Biochimie. 2010. V. 92. P. 418–422.
  14. Krasnoperov V., Deyev I.E., Serova O.V., Xu C., Lu Y., Buryanovsky L., Gabibov A.G., Neubert T.A., Petrenko A.G. // Biochemistry. 2009. V. 48. P. 3230–3238.

## OPTIMIZATION OF HETEROLOGICAL EXPRESSION OF INSULIN RECEPTOR-RELATED RECEPTOR ECTODOMAIN

A. A. Mozhaev, A. N. Orsa, I. E. Deyev, Academician of the RAS V. I. Shvets, A. G. Petrenko

Received December 01, 2018

In this paper, we present an approach to optimize the heterologous expression of the receptor tyrosine kinase IRR, which further simplifies the purification of the IRR from the medium and increases the final yield. The approach proposed by us can find application in the biotechnological production of other large-scale recombinant proteins produced for medical purposes.

*Keywords:* insulin receptor-related receptor, heterologous expression, receptor tyrosine kinase.