

УДК 577.29

## НОВЫЙ ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЦИТОКИНА TRAIL И ЕГО РЕЦЕПТОР СЕЛЕКТИВНОГО ВАРИАНТА DR5-B\*

© 2019 А.В. Яголович<sup>1,2</sup>, А.А. Артыков<sup>1,2</sup>, Д.А. Долгих<sup>1,2</sup>, М.П. Кирпичников<sup>1,2</sup>, М.Э. Гаспарян<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия; электронная почта: marine\_gasparian@yahoo.com

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 19.12.2018

После доработки 25.02.2019

Принята к публикации 26.02.2019

Цитокин TRAIL индуцирует апоптоз в опухолевых клетках различного происхождения, не затрагивая нормальные клетки. Клинические испытания агонистов рецепторов смерти DR4 и DR5 (рекомбинантный TRAIL или антитела к рецепторам смерти) в основном потерпели неудачу, поскольку большинство опухолей человека оказались к ним устойчивы. В настоящее время разрабатываются агенты второго поколения, нацеленные на TRAIL-R с повышенной биологической активностью. С этой целью нами был разработан вариант TRAIL DR5-B, избирательно взаимодействующий только с рецептором DR5. Мы разработали новый эффективный способ получения TRAIL и DR5-B, используя экспрессию этих белков в штамме *Escherichia coli* SHuffle B. Белки были выделены из цитоплазматической фракции клеток и очищены до высокой степени гомогенности с помощью металл-аффинной и ионообменной хроматографии. Выход белков составил 211 мг и 173 мг из одного литра культуры клеток для DR5-B и TRAIL соответственно, что значительно превышало результаты, полученные с помощью других методик. Препарат DR5-B эффективнее и быстрее убивал опухолевые клетки различного происхождения по сравнению с TRAIL. Полученные препараты можно использовать как для исследования сигнальных путей TRAIL, так и в доклинических и клинических испытаниях их противоопухолевой активности.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** цитокин TRAIL, мутантный вариант DR5-B, штамм *E. coli* SHuffle B, терапия рака.

DOI: 10.1134/S032097251906006X

Природный цитокин TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) является потенциальным средством для терапии опухолевых заболеваний, поскольку он способен селективно индуцировать апоптоз в опухолевых клетках, не затрагивая нормальные клетки [1]. Однако клинические испытания показали его низкую эффективность в связи с тем, что многие типы опухолей резистентны к TRAIL. Один из механизмов резистентности связан с наличием пяти рецепторов TRAIL, из которых лишь два, DR4 и DR5

(«рецепторы смерти»), проводят сигнал апоптоза, а DcR1, DcR2 и OPG (остеопротегерин) являются рецепторами-«ловушками» и не имеют функционального цитоплазматического «домена смерти» (death domain, DD), который необходим для индукции апоптоза [2]. На основе экспериментов по оверэкспрессии DcR1 и DcR2 предполагается, что эти рецепторы ингибируют индукцию апоптоза TRAIL вследствие захвата лиганда [3, 4]. Кроме того, была предложена версия, по которой DcR2 ингибирует TRAIL-индуцированный апоптоз, образуя лиганд-независимые неактивные комплексы с рецептором DR5, или вызывает индукцию сигнальных путей, препятствующих апоптозу, в частности, активацию NF-κB и MAPK/ERK [5–7]. Функции этих рецепторов могут различаться в различных типах клеток и остаются до конца не исследованными.

Принятые сокращения: МТТ – (3-[4,5-диметилтиазол-2]-2,5-дифенил тетразолия бромид; OPG – остеопротегерин, IPTG – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», BM 18-359, 29.04.2019.

\*\* Адресат для корреспонденции.

До сих пор не выяснен относительный вклад двух отдельных рецепторов смерти в индукцию апоптоза в различных типах опухолевых клеток. С помощью рецептор-селективных мутантных вариантов TRAIL было показано, что гибель клеток хронической лимфоцитарной лейкемии, острых миелоидных лейкозов и опухоли поджелудочной железы происходит путем активации рецептора DR4, тогда как DR5 является основным источником индукции апоптоза в других опухолевых клетках эпителиального происхождения [8]. Эта дифференциальная проапоптотическая эффективность DR4 и DR5 в зависимости от типа клетки/рака может быть использована в терапии.

Для получения рекомбинантного TRAIL преимущественно используются штаммы *E. coli*, где он имеет тенденцию к образованию телец включения [9–11]. Получение белковых препаратов из телец включения предполагает стадии солюбилизации и рефолдинга, для которых необходимы большие количества денатурирующих и восстанавливающих реагентов, что требует значительного времени и имеет высокую стоимость. Ранее сообщалось об экспрессии растворимого TRAIL в *E. coli* [11, 12], однако описание методик было неполным, а выход продукта был невысок. Для получения TRAIL в растворимой форме использовалась экспрессия слитных белков, включающих мальтозосвязывающий белок (MBP), b'a' домен дисульфид-изомеразы (PDIb'a') или тиоредоксин [13, 14]. Этот подход облегчает получение целевого белка, но плохо согласуется с требованиями к клиническим препаратам.

Ранее нами был получен рецептор-специфичный вариант TRAIL DR5-B с заменами аминокислотных остатков (Tyr189Asn, Arg191Lys, Gln193Arg, His264Arg, Ile266Leu и Asp269His). Он связывается с рецептором DR5 так же эффективно, как и TRAIL, но не связывается с рецептором DR4 и, в отличие от других рецептор-селективных мутантных вариантов, не взаимодействует с рецепторами-ловушками DcR1, DcR2 и OPG [14]. Исследования показали, что мутантный вариант DR5-B значительно эффективнее чем TRAIL дикого типа индуцирует апоптоз в различных линиях опухолевых клеток [15]. Вариант DR5-B был получен путем экспрессии в штамме *E. coli* BL21(DE3) в виде слитного белка с тиоредоксином с последующей очисткой после расщепления слитного белка энтеропептидазой [9, 14]. Этот способ позволил получить значительные количества растворимого белка, однако по ряду причин он не подходил для использования в клинических исследованиях. Дополнительный этап ферментативного расщеп-

ления слитного белка с последующей очисткой целевого белка увеличивал трудоемкость очистки, а также влиял на выход и себестоимость препарата из-за высокой стоимости протеиназы.

В данной работе мы описываем новый способ получения рекомбинантных белков TRAIL и DR5-B, основанный на прямой экспрессии в штамме *E. coli* SHuffle B с последующей очисткой целевого белка методами аффинной и ионообменной хроматографии. Относительно новый штамм-продуцент *E. coli* SHuffle B был разработан компанией «New England Biolabs» для улучшения рефолдинга белков в цитоплазме и, соответственно, увеличения растворимой формы белков при экспрессии [16]. Данная технология позволяет получить высокоочищенные и гомогенные тримерные препараты с высокими выходами и низким уровнем эндотоксинов. Полученный этим методом препарат DR5-B продемонстрировал повышенную, по сравнению с TRAIL, цитотоксическую активность на линиях опухолевых клеток различного происхождения. Высокий выход белка и чистота препарата позволяют применить разработанную технологию при исследовании препарата DR5-B в клинике.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Реактивы и материалы.** Линии клеток острой T-лимфобластной лейкемии Jurkat и фибробластов крайней плоти человека (HFF) были получены из Института Цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Линии клеток колоректальной карциномы HCT116 и Сасо-2 были получены из ATCC (США). Питательные среды для культивирования клеток (DMEM, EMEM, RPMI1640), 0,05%-ный раствор трипсина с ЭДТА, фосфатно-солевой буфер и МТТ («ПанЭко», Россия), бычья эмбриональная сыворотка («HyClone Laboratories, Inc.», США), остальные реактивы («PanReac AppliChem», Германия).

**Получение плазмидного вектора pET32a/sdr5-b и pET32a/strail для прямой экспрессии.** В последовательность ДНК, кодирующую слитный белок Trx/DR5-B в составе плазмидного вектора pET32a/dr5-b, ранее полученного авторами [14], были введены три точечные мутации Gly469Cys, Cys471Thr, Ala473Thr методом сайт-специфического мутагенеза с использованием олигонуклеотидных праймеров gggtaccgacgacgaccatgatggtagagaaagaggtcctc (прямой) и agggacctcttctctccatgatggctgctgctggtacc (обратный) («Евроген», Россия).

Аmplификацию проводили при следующих условиях: 30 с при 95 °С, 30 с при 55 °С, 14,5 мин при 72 °С, 30 циклов. Синтез амплифицирован-

ной ДНК проверяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Реакционную смесь обрабатывали рестриктазой *Dpn I* («Thermo Fisher Scientific», США) в течение 1 ч при 37 °С. Для наработки ДНК реакционную смесь трансформировали в бактериальный штамм *E. coli* XL-1 Blue («Евроген», Россия), клетки выращивали в среде LB с ампициллином (100 мкг/мл) при 37 °С при перемешивании 250 об/мин («Thermo Fisher Scientific», США) в течение 18 ч, после чего выделяли плазмидную ДНК из клеточной биомассы с помощью набора GeneJET Plasmid MiniPrep kit («Thermo Fisher Scientific», США). Наличие мутаций в гене DR5-В подтверждали автоматическим секвенированием в компании «Евроген» (Россия).

Полученную плазмиду с дополнительным сайтом рестрикции *NdeI* обрабатывали рестриктазами *XhoI* и *NdeI*, что приводило к образованию 4-х фрагментов: линеаризованный плазмидный вектор (5445 п.н.), фрагмент гена DR5-В (504 п.н.), фрагмент с геном тиоредоксина (345 п.н.) и фрагмент тагов (129 п.н.), в котором находился дополнительный сайт рестрикции *NdeI*. После разделения в 1%-ном агарозном геле фрагменты ДНК линеаризованного плазмидного вектора и гена DR5-В элюировали из геля с помощью набора QIAQuick Gel Extraction kit («Qiagen», США) и лигировали с помощью T4 ДНК лигазы при 10 °С в течение 16 ч. Реакционную смесь трансформировали в штамм *Escherichia coli* XL-1 Blue и выделили плазмидную ДНК pET-32a/sdr5-b. Правильную вставку гена в плазмиду подтвердили определением нуклеотидной последовательности встроеного гена. Аналогичную процедуру провели с плазмидным вектором pET-32a/TRAIL, предназначенным для экспрессии TRAIL дикого типа.

**Экспрессия и очистка рекомбинантных белков TRAIL и DR5-В.** Экспрессию белков TRAIL и DR5-В (а.о. 114–281) проводили в бактериальном штамме *E. coli* SHuffle B («New England Biolabs», Англия). Клетки трансформировали плазмидными векторами pET-32a/sdr5-b и pET-32a/sTRAIL и выращивали в жидкой питательной среде LB с ампициллином (100 мкг/мл) при 37 °С при интенсивном перемешивании (250 об/мин) в течение 17 ч. После этого ночную культуру разбавляли (1 : 100) в жидкой среде LB с ампициллином (100 мкг/мл), инкубировали при 37 °С до значения  $OD_{600} = 0,6$  и индуцировали экспрессию целевых белков добавлением индуктора T7 промотора 0,1 мМ IPTG (изопропил β-D-1-тиогалактопиранозид). Культуры клеток выращивали при 28 °С в течение 20 ч. Уровень экспрессии целевого белка анализировали в 15%-ном полиакриламидном геле в присут-

ствии додецилсульфата натрия. После этого клетки осаждали центрифугированием при 5000 g («Beckman Coulter», США) при 4 °С в течение 10 мин, ресуспендировали в буфере, содержащем 300 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), и разрушили под давлением 2000 psi на установке «French press» («Spectronic Instruments, Inc.», США). Разрушенную клеточную массу осаждали центрифугированием при 75 000 g («Beckman Coulter», США) в течение 30 мин. В растворимую клеточную фракцию добавляли 0,05% (v/v) Triton X-100 и наносили на хроматографическую колонку с сорбентом Ni-NTA агарозой («Qiagen», США). Целевые белки элюировали в буфере, содержащем 300 мМ NaCl, 50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250 мМ имидазол (pH 8,0). Очищенный препарат диализовали против буфера, содержащего 45 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, 5 мМ β-меркаптоэтанола (pH 7,5), при комнатной температуре в течение 18 ч. Далее к раствору белка добавляли 0,05% (v/v) Triton X-100 и очищали на сорбенте SP Sepharose («GE Healthcare», Швеция) в 0–500 мМ линейном градиенте NaCl на установке АКТА-FPLC («GE Healthcare», Швеция). Белковые препараты диализовали против буфера, содержащего 150 мМ NaCl (pH 7,5), в течение 18–20 ч при 4 °С, стерилизовали фильтрацией через стерильный фильтр для шприцов («Millipore», США) с порами 0,2 мкм с мембраной из поливинилдифторида (PVDF) и хранили при 4 °С. Пробы после каждой стадии очистки анализировали в 15%-ном полиакриламидном геле при окрашивании краской Кумасси бриллиантовый синий R250 или нитратом серебра [16, 17]. Концентрацию белка во время очистки определяли по методу Бредфорда [18]. Концентрацию очищенных препаратов определяли при длине волны 280 нм на спектрофотометре Ultraspec 2100 («Bio-Rad», США) с использованием молярных коэффициентов экстинкции 25 520 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> для TRAIL и 24 180 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> для DR5-В, определенных по аминокислотной последовательности с помощью программы ProtParam на сервере ExPASy ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)).

Оценку содержания белка в полиакриламидных гелях проводили путем денситометрии с использованием соответствующей опции программы ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Данная программа позволяет рассчитать интенсивность серого цвета в выделенной области черно-белого изображения полиакриламидного геля, что позволяет сравнить содержание белка в геле.

**Очистка препаратов от эндотоксинов.** Препараты DR5-В и TRAIL дополнительно очищали на аффинном сорбенте Pierce High Capacity Endotoxin Removal Resin («Thermo Fisher Scientific», США). Очищенные белковые препараты инку-

бирова́ли с 10 мл сорбента в течение 2 ч при комнатной температуре при медленном перемешивании. Затем смесь белков с сорбентом наносили на колонку и собирали белковую фракцию. Содержание эндотоксинов оценивали с помощью набора ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit («GenScript», США).

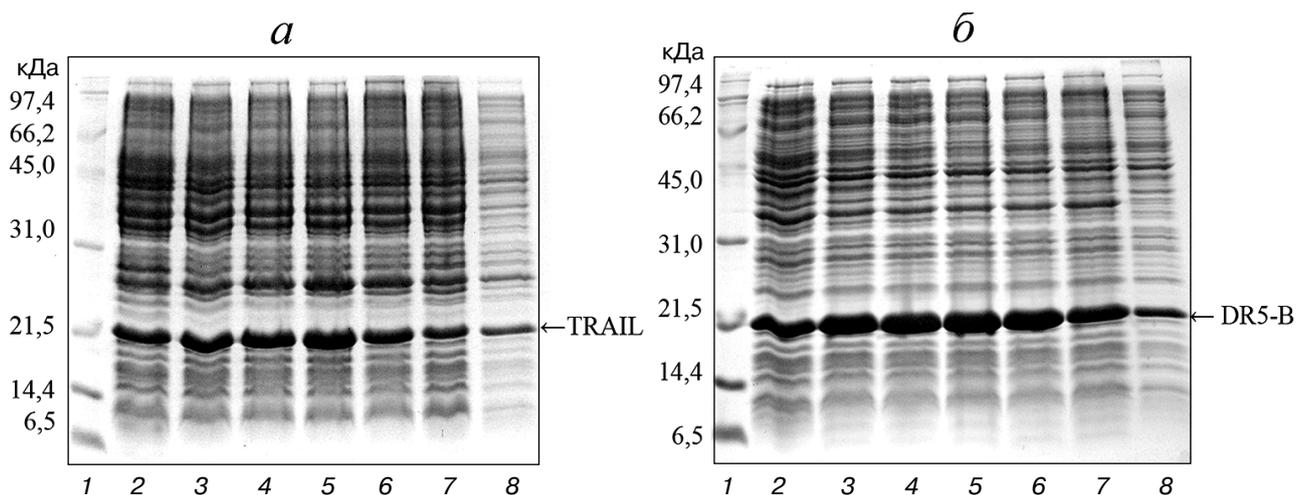
**Аналитическое ультрацентрифугирование.** Для определения гомогенности очищенных препаратов DR5-B и TRAIL проводили аналитическое ультрацентрифугирование на центрифуге Beckman Model E («Beckman Coulter», США) при концентрации белков 1 мг/мл в стандартных пробирках по 0,4 мл при 60 000 об/мин. Коэффициент седиментации  $s_{20,w}$  вычисляли с помощью программного обеспечения SEDFIT.

**Исследование биологической активности препарата на линиях опухолевых клеток.** Линии клеток колоректальной карциномы HCT116, Caco-2, а также клетки фибробластов крайней плотности человека HFF культивировали в питательной среде DMEM, содержащей 10% (v/v) бычьей эмбриональной сыворотки. Суспензионные клетки линии Т-лимфобластной лейкемии Jurkat культивировали в питательной среде RPMI1640, содержащей 10% (v/v) бычьей эмбриональной сыворотки. Все линии клеток культивировали при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Клетки переносили в стерильные 96-луночные планшеты (1 × 10<sup>5</sup> клеток на лунку для HCT116 и Caco-2, 5 × 10<sup>5</sup> клеток для Jurkat) и инкубировали с препаратами TRAIL и DR5-B в течение 24 ч. Для определения жизнеспособности клеток добавляли МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2]-2,5-дифенил тетразолия

бромид) в конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали в течение 3 ч при 37 °С. Планшеты центрифугировали при 3000 об/мин («ELMI», Латвия) в течение 5 мин, удаляли надосадочную жидкость, в каждую лунку добавляли диметилсульфоксид (ДМСО), оптическую плотность содержимого лунок измеряли с помощью планшетного спектрофотометра iMark («Bio-Rad», США) при длине волны 450 нм с вычитанием фона при 655 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Экспрессия и очистка белков TRAIL и DR5-B в штамме *E. coli* SHuffle B.** Для прямой экспрессии белков TRAIL и DR5-B полученные плазмидные векторы pET-32a/sdr5-b и pET-32a/sTRAIL трансформировали в высокопроизводительный штамм *E. coli* SHuffle B. Этот штамм *E. coli*, благодаря сниженной активности редуктаз *gor* и *trxB* наряду с повышенной экспрессией изомеразы дисульфидных связей DsbC, позволяет получить высокий уровень цитоплазматической экспрессии активных белков с правильно образованными дисульфидными связями [19]. Клетки культивировали с различными концентрациями индуктора T7 промотора IPTG, и содержание целевого белка анализировали в 15%-ном полиакриламидном геле (рис. 1). Экспрессию TRAIL и DR5-B наблюдали и в отсутствие IPTG, но в присутствии индуктора она существенно повышалась. В дальнейших экспериментах для очистки белков клетки выращивали в присут-



**Рис. 1.** Экспрессия белков TRAIL (а) и DR5-B (б) в штамме *E. coli* SHuffle B при индукции IPTG в различных концентрациях. Пробы, содержащие по 10 мкл ночной культуры, центрифугировали при 5000 g в течение 5 мин, растворяли в буфере для проб и анализировали в 15%-ном Tris-глициновом Ds-Na-ПААГ. Дорожки: 1 – маркеры молекулярных масс; 2 – культуры клеток, выращенные без индуктора; 3–7 – культуры клеток, выращенные в присутствии 0,02, 0,05, 0,1, 0,25 и 0,5 mM IPTG соответственно; 8 – 10 мкг белка из растворимой фракции цитоплазматических белков при индукции экспрессии 0,1 mM IPTG

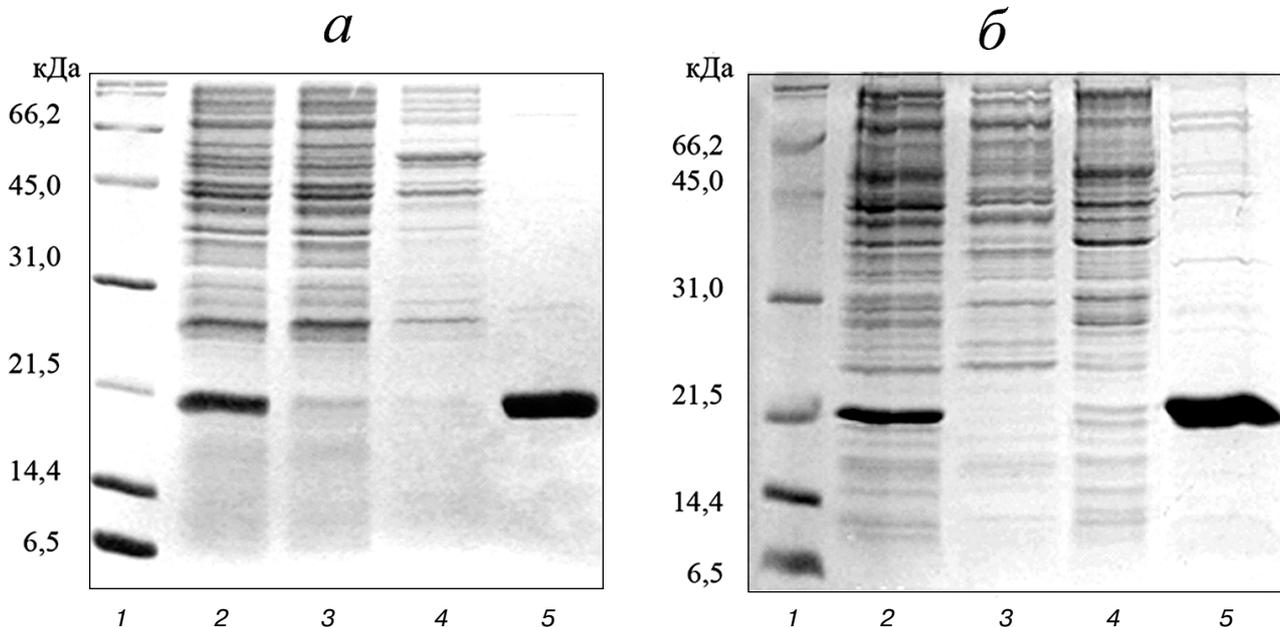
ствии 0,1 мМ IPTG. Уровень экспрессии DR5-B был выше по сравнению с TRAIL и составлял ~25% от общего количества белка. Оценка содержания белка в полиакриламидных гелях, проводимая при помощи денситометрии с использованием соответствующей опции программы ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), показала, что уровень экспрессии при индукции 0,1 мМ IPTG составил примерно 676 мг для TRAIL и 782 мг для DR5-B в 1 литре культуры клеток, и белки на 45–50% находились в растворимой форме (рис. 1, дорожка 8).

На первом этапе экспрессированные белки из растворимой фракции клеточного лизата очищали с помощью металл-аффинной хроматографии на сорбенте Ni-NTA. Благодаря наличию нескольких гистидиновых остатков в аминокислотной последовательности TRAIL прочно связывался с сорбентом Ni-NTA даже в отсутствие полигистидинового тага. В результате рекомбинантные белки TRAIL и DR5-B были эффективно очищены, и чистота препаратов составляла ~85% (рис. 2).

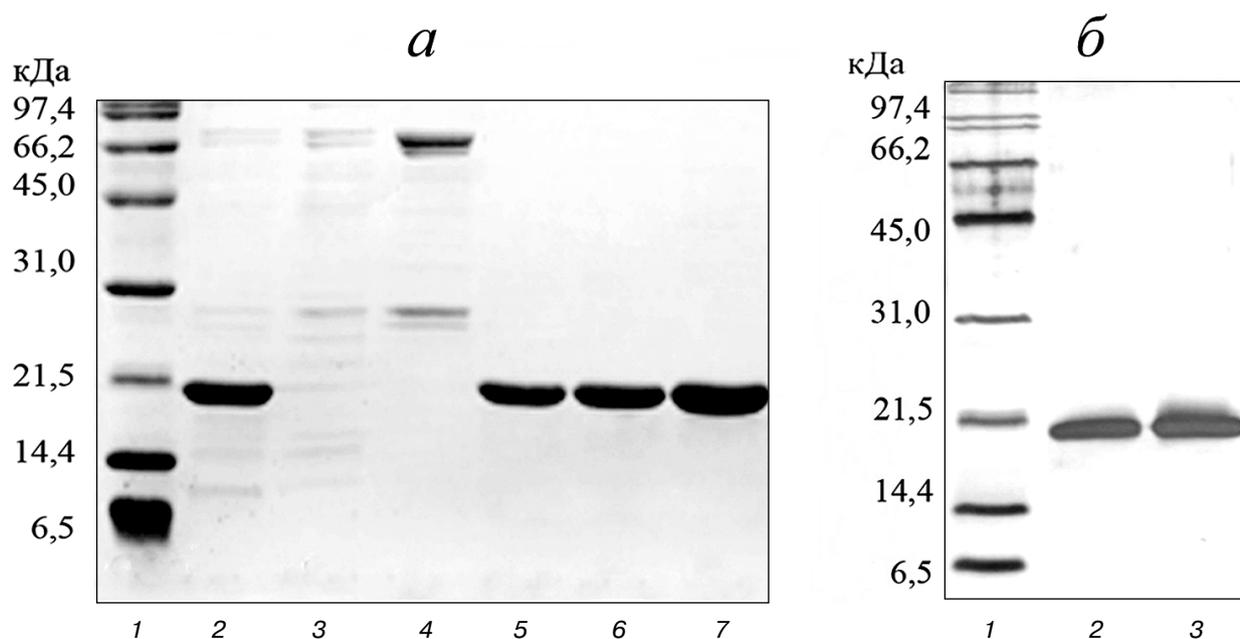
Для получения высокоочищенных белковых препаратов был проведен второй этап очистки с помощью катионообменной хроматографии на сорбенте SP Sepharose, который способен связывать 50–100 мг белка на мл сорбента. Очищенные на Ni-NTA агарозе белковые растворы

диализовали против буфера, содержащего 45 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, 5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанола и наносили на колонку с 10 мл SP Sepharose. Элюировали белок линейным градиентом NaCl (0–500 мМ). Белок выходил из колонки при концентрациях соли 150–250 мМ. В результате были получены белковые растворы, практически не содержащие примесей нецелевых полипептидов (рис. 3). Разработанная технология позволила получить высокоочищенные белки TRAIL и DR5-B в количестве 173 и 211 мг из одного литра клеточной культуры соответственно. Выходы белковых препаратов TRAIL и DR5-B в ходе очистки приведены в табл. 1.

Гомогенность и степень тримеризации полученных препаратов исследовали методом аналитического ультрацентрифугирования (рис. 4). Были определены коэффициенты седиментации  $s_{20,w} = 5,49 \pm 0,03$  и  $s_{20,w} = 5,61 \pm 0,03$ , что соответствует молекулярными массами  $M_w = 59\,105$  Да и  $M_w = 59\,156$  Да для TRAIL и DR5-B соответственно. Молекулярные массы мономеров TRAIL и DR5-B, рассчитанные на основе их аминокислотных последовательностей, составляют 19 624,04 и 19 616,11 Да соответственно, так что молекулярные массы обоих препаратов, определенные с помощью аналитического ультрацентрифугирования, соответствуют их тримерам. Исходя из формы кривых на рис. 4 можно сказать, что пре-



**Рис. 2.** Очистка белков TRAIL и DR5-B с помощью металл-аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе. Пробы, содержащие 15 мкг белка, анализировали на 15%-ном Ds-Na-ПААГ. Дорожки: 1 – маркеры молекулярных масс; 2 – растворимая фракция цитоплазматических белков; 3 – фракция белков, не связавшихся с Ni-NTA агарозой; 4 – фракция белков, отмытых с помощью буфера, содержащего 20 мМ имидазола; 5 – фракция белков, отмытых буфером, содержащим 250 мМ имидазола



**Рис. 3.** Очистка белка DR5-B с помощью ионообменной хроматографии на сорбенте SP Sepharose. Пробы, содержащие 10–15 мкг белка, анализировали на 15%-ном Ds-Na-ПААГ. *а* – Дорожки: 1 – маркеры молекулярных масс; 2 – белковая фракция после очистки на первом этапе на Ni-NTA агарозе; 3 – фракция белков, не связавшихся с SP Sepharose; 4 – фракция белков, вышедших с колонки при 100 мМ хлорида натрия; 5–7 – фракции белков после очистки на сорбенте SP Sepharose. *б* – Анализ чистоты полученных препаратов при окрашивании полиакриламидного геля нитратом серебра. Дорожки: 1 – маркеры молекулярных масс; 2 – TRAIL (500 нг); 3 – DR5-B (500 нг)

параты являются высокоомогенными и состоят из тримерных молекул.

**Очистка препаратов TRAIL и DR5-B от эндотоксинов.** Содержание эндотоксинов в очищенных препаратах оценивали с помощью набора ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit по инструкции производителя. При очистке белков без добавления детергента Triton X-100 уровень эндотоксинов составлял >35 ед/мг (данные не показаны), что является довольно низким показателем для рекомбинантных белков, очищенных из штаммов *E. coli*. Относительно низкое содержание эндотоксинов, возможно, обусловлено использованием стадии катион-обменной хроматографии [20]. Было исследовано влияние детергента Triton X-100 в ходе очистки на содержание эндотоксинов в препарате. При добавлении низкой концентрации Triton X-100 (0,05%) на стадиях очистки уровень эндотоксинов снизился в 5 раз и составил  $8 \pm 0,8$  ед/мг (табл. 2). Такое содержание эндотоксинов позволяет применять препарат в биологических и доклинических исследованиях, однако превышает предельно допустимую дозу для использования в клинических испытаниях ( $\leq 5$  ед/кг/ч). Поэтому препараты были дополнительно очищены на аффинном сорбенте Pierce High

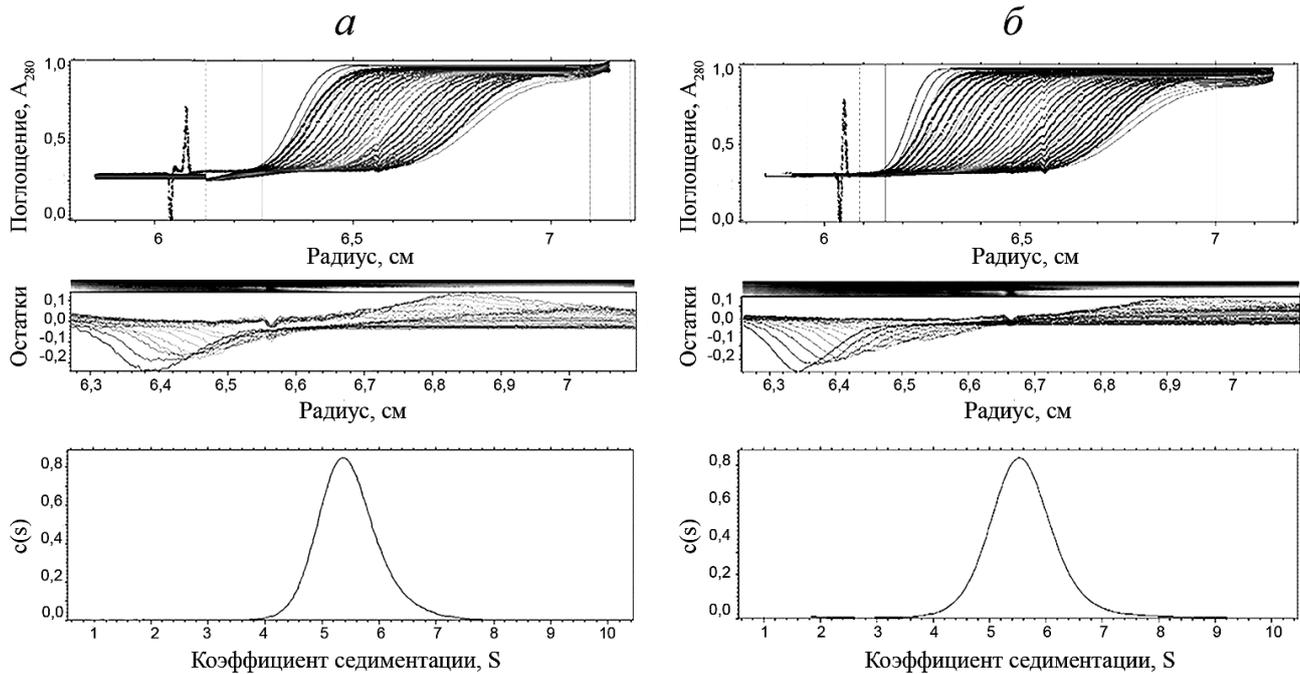
Capacity Endotoxin Removal Resin с ковалентно-связанным  $\epsilon$ -поли-L-лизином для удаления эндотоксинов. Итоговое содержание эндотоксинов в очищенных препаратах TRAIL и DR5-B не превышало 0,5 ед/мг (табл. 2). Надо отметить, что в ходе очистки препаратов от эндотоксинов потери белков были незначительны (1–2%).

**Цитотоксическая активность препаратов TRAIL и DR5-B.** Цитотоксическая активность полученных препаратов TRAIL и DR5-B была исследована на линиях клеток колоректальной карциномы HCT116 и Caco-2, а также Т-лим-

**Таблица 1.** Выходы белков TRAIL и DR5-B из 1 л клеточной культуры в ходе очистки

Стадии очистки	DR5-B, мг	TRAIL, мг
Растворимая фракция цитоплазматических белков*	1544	1523
Очистка на Ni-NTA*	348	275
Очистка на SP Sepharose**	211	173

\* Количество белка, определенное по методу Бредфорда.  
\*\* Количество белка, определенное по поглощению при 280 нм с учетом коэффициента экстинкции.



**Рис. 4.** Результаты аналитического ультрацентрифугирования препаратов TRAIL (а) и DR5-B (б). Препараты центрифугировали при 60 000 об/мин в стандартных ячейках 0,4 мл при концентрации 1 мг/мл. Профили седиментации белков регистрировались при поглощении 280 нм. Параметр  $c(s)$  является коэффициентом непрерывного распределения седиментации, определенным с помощью программы SEDFIT (<http://www.analyticalultracentrifugation.com>)

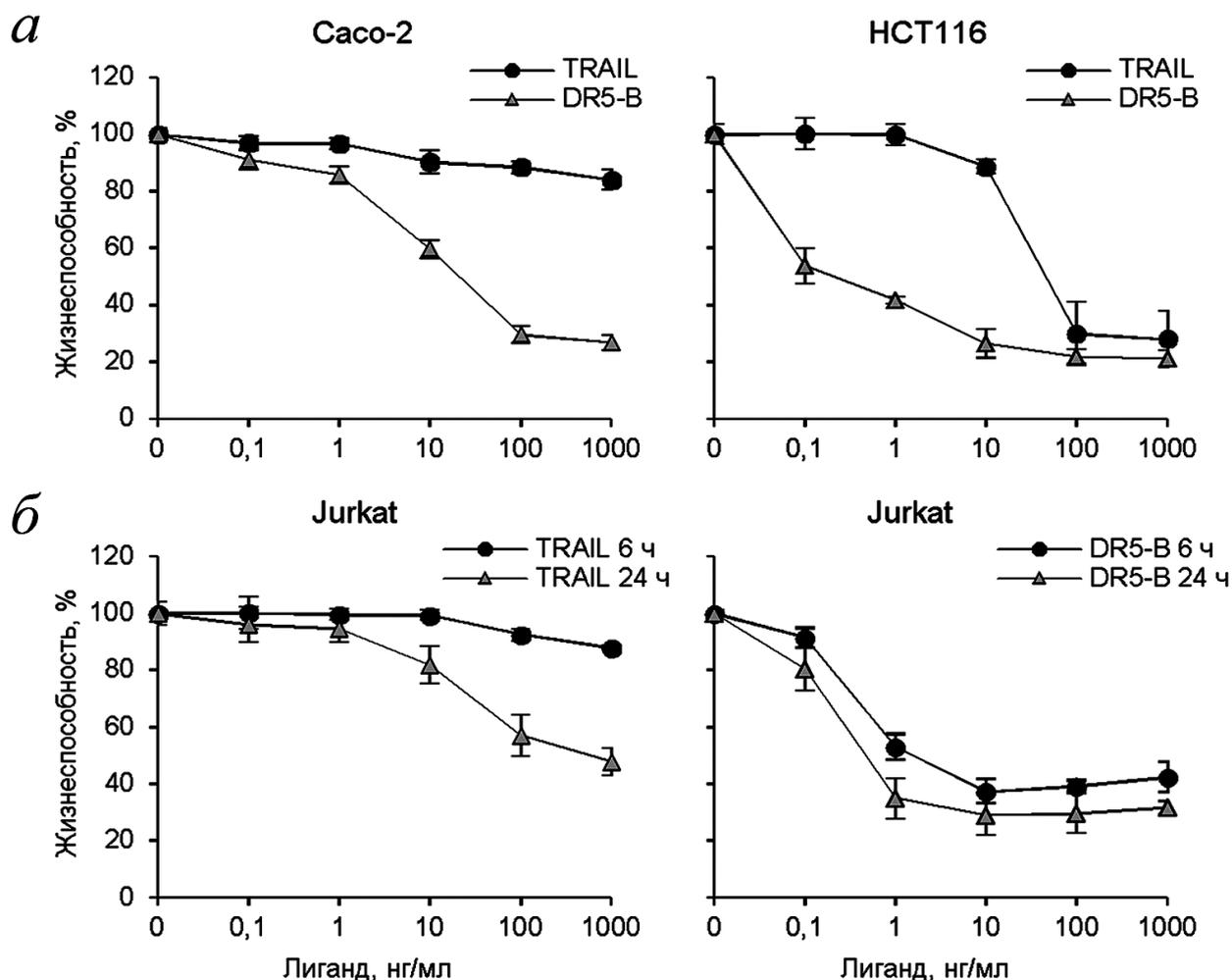
фобластной лейкемии Jurkat (рис. 5). Белок DR5-B эффективно убивал клетки HCT116 и Jurkat при концентрациях 0,1–1 нг/мл, тогда как TRAIL проявлял цитотоксическую активность при концентрациях >10 нг/мл. Кроме того, препарат DR5-B намного быстрее убивал клетки линии Jurkat по сравнению с TRAIL (рис. 5, б). За 6 ч под действием DR5-B погибло всего на 10% меньше клеток по сравнению с инкубацией 24 ч, тогда как TRAIL был неэффективен при инкубации 6 ч. Клетки линии Сасо-2 были практически резистентны к TRAIL, тогда как DR5-B вызывал гибель этих клеток на 80%. Ранее на клетках линии Colo205 было показано, что рецептор-селективный вариант TRAIL-D269H/E195R усиливал кинетику активации рецептора DR5, так как обходил лиганд-индуцированную гетероолигомеризацию рецептора DR5 с рецепторами ловушек, в ходе чего увеличивался апоптоз [21]. Однако в клетках Jurkat и Сасо-2 уровень поверхностной экспрессии рецепторов ловушек крайне низок [15, 22] для существенного ингибирования TRAIL-опосредованного апоптоза. Мы полагаем, что степень олигомеризации рецептора DR5 при связывании с DR5-B выше по сравнению с TRAIL, что усиливает сигнала апоптоза. Ранее было показано, что при связывании TRAIL на предварительно димеризованных DR5 происходит клас-

теризация рецепторов в высокоорганизованную сеть, которая требуется, чтобы вызвать эффективный апоптоз [23]. Интересно, что димерный пептид, который связывается с рецептором DR5, вызывал апоптоз в клетках ВJAB, но не убивал клетки Jurkat и HCT116 из-за отличия уровня олигомеризации DR5 на поверхности клетки перед добавлением лиганда [24].

Надо отметить, что препараты DR5-B и TRAIL, полученные в данной работе при прямой экспрессии и полученные в ходе экспрессии в виде слитного белка с тиоредоксином (TRAIL-1 и DR5-B-1) [15], демонстрировали одинаковую цитотоксическую активность на клетках HCT116 и Jurkat (рис. 6). Как препараты TRAIL, так и DR5-B не проявили цитотоксич-

**Таблица 2.** Содержание липополисахаридов (ЛПС) в пробах препаратов TRAIL и DR5-B до и после очистки на аффинном сорбенте для удаления эндотоксинов

Стадии очистки	Содержание ЛПС, ед/мг	
	TRAIL	DR5-B
До очистки	8,7 ± 0,8	8,2 ± 0,80
После очистки	0,48 ± 0,03	0,45 ± 0,03



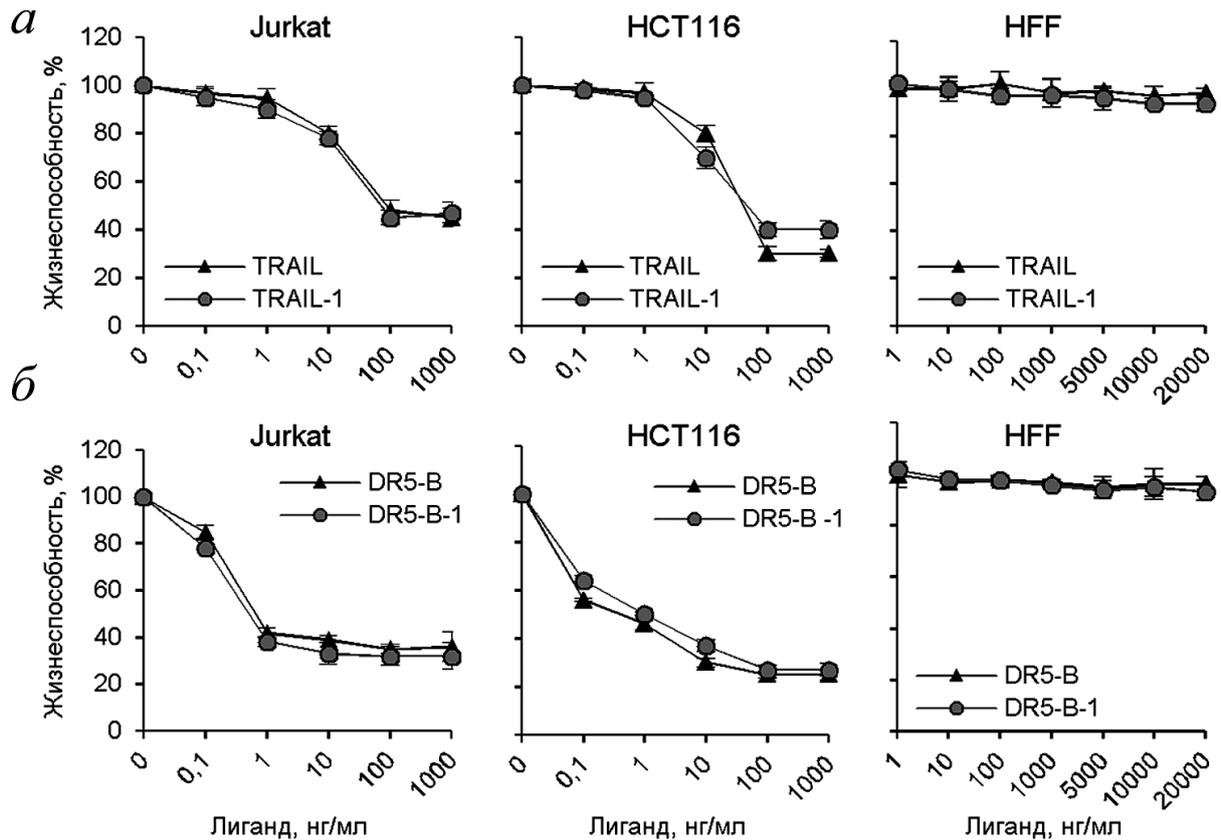
**Рис. 5.** Цитотоксическая активность рекомбинантных белковых препаратов TRAIL и DR5-B на различных линиях опухолевых клеток. Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста. *а* – Клетки колоректальной карциномы НСТ116 и Сасо-2 инкубировали с препаратами в течение 24 ч. *б* – Клетки острой Т-лимфобластной лейкемии Jurkat инкубировали с препаратами в течение 6 ч и 24 ч. Значения представлены как средние  $\pm$  средноквадратичное отклонение ( $n = 3$ )

ности по отношению к нетрансформированным клеткам фибробластов крайней плоти человека (НФФ) (рис. 6), что указывает на то, что разработанный новый способ получения DR5-B не повлиял на его специфическую активность.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гибридная экспрессия рекомбинантных белков, слитных с доменом «несущего» белка, является удобным способом получения белков для молекулярно-биологических исследований. К примеру, ранее был разработан способ цитоплазматической экспрессии цитокина TRAIL в виде слитного белка с мальтоз-связывающим белком (МВР), где слитный белок расщепляют протеиназой вируса гравировки табака с последующей

очисткой целевого белка [13]. Выход белка, по данным этой работы, составил 36 мг из 1 литра культуры клеток. Известен также способ цитоплазматической экспрессии цитокина TRAIL с тагом Fh8- $\Delta$ I-СМ, где Fh8 – полипептид (8 кДа) низкомолекулярного антигена печеночной двуустки (*Fasciola hepatica*), который улучшает растворимость белка, а  $\Delta$ I-СМ – кальмодулин-связывающий полипептид, способный расщепляться при низких значениях рН [25]. Выход белка в данной работе составил 77,5 мг белка из 1 литра культуры клеток с чистотой 89%. В нашей лаборатории ранее был разработан способ получения вариантов TRAIL путем экспрессии в штамме *E. coli* BL21(DE3) гибридного белка с тиоредоксином, где растворимость слитного белка составила 20% от общей экспрессии [9, 14].



**Рис. 6.** Сравнительный анализ цитотоксической активности препаратов TRAIL и DR5-B, полученные способами прямой экспрессии в штамме *E. coli* SHuffle B и при экспрессии в составе слитного белка с тиоредоксином в штамме BL23(DE3) (TRAIL-1 и DR5-B-1). Клетки HCT116, Jurkat и HFF инкубировали с препаратами TRAIL (а) и DR5-B (б) в течение 24 ч, и жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста. Значения представлены как средние  $\pm$  среднеквадратичное отклонение ( $n = 3$ )

Однако белки терапевтического назначения, полученные гибридным способом, имеют ряд ограничений по использованию в качестве лекарственных препаратов. Гибридная экспрессия подразумевает применение специфических протеиназ для отщепления «несущего» белка. Несмотря на то, что эти протеазы расщепляют слитные белки по специфическому сайту, расположенному между несущим и целевым белком, при расщеплении образуются следовые количества продуктов неспецифического расщепления, от которых трудно избавляться. Кроме того, процесс очистки целевого белка включает дополнительный этап удаления протеиназ. Использование препаратов протеиназ значительно повышает стоимость итогового продукта в связи с большой трудозатратностью и высокой стоимостью фермента, что затрудняет задачу масштабирования производства препарата для клинических испытаний.

Поскольку противоопухолевый цитокин TRAIL является потенциальным средством для терапии опухолевых заболеваний, была постав-

лена задача: разработать новый способ получения цитокина с высоким выходом и низкой себестоимостью. Для этого была разработана новая стратегия для экспрессии и очистки цитокина TRAIL. Белок был впервые экспрессирован в штамме *E. coli* SHuffle B без несущих белков и тегов в растворимой форме. Это позволило облегчить процедуру очистки и увеличить выход целевого белка. В ходе двух этапов очистки (аффинной и ионообменной хроматографии) получили 173 и 211 мг препаратов TRAIL и DR5-B соответственно с чистотой 98%. Более высокий выход DR5-B, возможно, связан с высокой растворимостью белка, обусловленной заменами гидрофобных и незаряженных аминокислотных остатков на гидрофильные и заряженные остатки (такие как Tyr189Asp, Gln193Arg, His264Arg) [14].

Благодаря применению детергента Triton X-100 в низких концентрациях (0,05%) на стадиях очистки удалось снизить уровень бактериальных эндотоксинов в препарате в 3–4 раза (с 35 до 8,2 ед/мг), что все равно выше допустимой нормы (5 ед/кг веса) для клинических испытаний препарата [26]. Так как терапевтические

дозы препаратов TRAIL достаточно высоки (5–10 мг/кг веса), необходимо, чтобы уровень эндотоксинов в препарате TRAIL или DR5-B не превышал 0,5 ед/кг [27]. Препараты были дополнительно очищены от эндотоксинов на специальном эндотоксин-связывающем сорбенте, что позволило снизить уровень до допустимой концентрации (<0,5 ед/мл).

Рецептор-селективный мутантный вариант DR5-B эффективнее убивал опухолевые клетки HCT116 по сравнению с TRAIL, что было показано нами ранее с препаратами, полученными путем экспрессии слитных белков с тиоредоксином в штамме *E. coli* BL23(DE3) [15, 28]. Кроме того, DR5-B убивал клетки линии Jurkat не только эффективнее, но и быстрее по сравнению с TRAIL, что не менее важно, так как препарат TRAIL довольно быстро вымывается из крови человека (период полувыведения ~30 мин) [29]. Резистентные к TRAIL клетки Сасо-2 были весьма чувствительны к DR5-B. Возможно, из-за высокой поверхностной экспрессии рецептора DR5 [22] лиганд-индуцированная олигомеризация этого рецептора выше при связывании с

DR5-B по сравнению с TRAIL, что способствует формированию активных индуцирующих смерть сигнальных комплексов и усилению сигнала апоптоза.

Таким образом, разработанная технология получения противоопухолевого цитокина TRAIL и его мутантного варианта DR5-B позволяет получить относительно недорогие препараты с высокой степенью очистки и может быть применена для наработки препаратов для терапии онкологических заболеваний различного происхождения.

**Финансирование.** Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-34-00812 и № 16-04-00668) и гранта Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Guicciardi, M.E., and Gores, G.J. (2009) Life and death by death receptors, *FASEB J.*, **23**, 1625–1637, doi: 10.1096/fj.08-111005.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., and Dixit, V.M. (1997) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL, *Science*, **276**, 111–113, doi: 10.1126/science.276.5309.111.
- Degli-Esposti, M.A., Smolak, P.J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C.P., DuBose, R.F., Goodwin, R.G., and Smith, C.A. (1997) Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family, *J. Exp. Med.*, **186**, 1165–1170, doi: 10.1084/jem.186.7.1165.
- Degli-Esposti, M.A., Dougall, W.C., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Smith, C.A., and Goodwin, R.G. (1997) The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain, *Immunity*, **7**, 813–820, doi: 10.1016/S1074-7613(00)80399-4.
- Merino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E., and Micheau, O. (2006) Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 7046–7055, doi: 10.1128/MCB.00520-06.
- Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., Lenardo, M.J., and Chan, F.K. (2005) Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 18099–18104, doi: 10.1073/pnas.0507329102.
- Nguyen, P.T., Nguyen, D., Chea, C., Miyauchi, M., Fujii, M., and Takata, T. (2018) Interaction between N-cadherin and decoy receptor-2 regulates apoptosis in head and neck cancer, *Oncotarget*, **9**, 31516–31530, doi: 10.18632/oncotarget.25846.
- Van Roosmalen, I.A., Quax, W.J., and Kruyt, F.A. (2014) Two death-inducing human TRAIL receptors to target in cancer: similar or distinct regulation and function? *Biochem. Pharmacol.*, **91**, 447–456, doi: 10.1016/j.bcp.2014.08.010.
- Gasparian, M.E., Ostapchenko, V.G., Yagolovich, A.V., Tsygannik, I.N., Chernyak, B.V., Dolgikh, D.A., and Kirpichnikov, M.P. (2007) Overexpression and refolding of thioredoxin/TRAIL fusion from inclusion bodies and further purification of TRAIL after cleavage by enteropeptidase, *Biotechnol. Lett.*, **29**, 1567–1573, doi: 10.1007/s10529-007-9446-y.
- Lin, Z., Lei, H., and Cao, P. (2007) Expression, purification, and in vitro refolding of soluble tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL), *Protein Expr. Purif.*, **51**, 276–282, doi: 10.1016/j.pep.2006.07.026.
- Wang, D., and Shi, L. (2009) High-level expression, purification, and in vitro refolding of soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **157**, 1–9, doi: 10.1007/s12010-007-8079-x.
- Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtry, A.E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I.L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokhi, Z., and Schwall, R.H. (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand, *J. Clin. Invest.*, **104**, 155–162, doi: 10.1172/JCI6926.
- Do, B.H., Nguyen, M.T., Song, J.A., Park, S., Yoo, J., and Jang, J. (2017) Soluble prokaryotic expression and purification of bioactive tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 2156–2164, doi: 10.4014/jmb.1705.05070.
- Gasparian, M.E., Chernyak, B.V., Dolgikh, D.A., Yagolovich, A.V., Popova, E.N., Sycheva, A.M.,

- Moshkovskii, S.A., and Kirpichnikov, M.P. (2009) Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor 5, *Apoptosis*, **14**, 778–787, doi: 10.1007/s10495-009-0349-3.
15. Gasparian, M.E., Bychkov, M.L., Yagolovich, A.V., Dolgikh, D.A., and Kirpichnikov, M.P. (2015) Mutations enhancing selectivity of antitumor cytokine TRAIL to DR5 receptor increase its cytotoxicity against tumor cells, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1080–1091, doi: 10.1134/S0006297915080143.
  16. Simpson, R.J. (2010) Rapid coomassie blue staining of protein gels, *Cold Spring Harb. Protoc.*, **2010**, pdb.prot5413, doi: 10.1101/pdb.prot5413.
  17. Switzer, R.C. 3rd, Merrill, C.R., and Shifrin, S. (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.*, **98**, 231–237, doi: 10.1016/0003-2697(79)90732-2.
  18. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
  19. Lobstein, J., Emrich, C.A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., and Berkmen, M. (2012) SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm, *Microb. Cell Fact.*, **11**, 56, doi: 10.1186/1475-2859-11-56.
  20. Reichelt, P., Schwarz, C., and Donzeau, M. (2006) Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents, *Protein Expr. Purif.*, **46**, 483–488, doi: 10.1016/j.pep.2005.09.027.
  21. Szegezdi, E., van der Sloot, A.M., Mahalingam, D., O’Leary, L., Cool, R.H., Munoz, I.G., Montoya, G., Quax, W.J., de Jong, S., Samali, A., and Serrano, L. (2012) Kinetics in signal transduction pathways involving promiscuous oligomerizing receptors can be determined by receptor specificity: apoptosis induction by TRAIL, *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, doi: 10.1074/mcp.M111.013730.
  22. Van Geelen, C.M., de Vries, E.G., Le, T.K., van Weeghel, R.P., and de Jong, S. (2003) Differential modulation of the TRAIL receptors and the CD95 receptor in colon carcinoma cell lines, *Br. J. Cancer*, **89**, 363–373, doi: 10.1038/sj.bjc.6601065.
  23. Valley, C.C., Lewis, A.K., Mudaliar, D.J., Perlmutter, J.D., Braun, A.R., Karim, C.B., Thomas, D.D., Brody, J.R., and Sachs, J.N. (2012) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces death receptor 5 networks that are highly organized, *J. Biol. Chem.*, **287**, 21265–21278, doi: 10.1074/jbc.M111.306480.
  24. Chekkat, N., Lombardo, C.M., Seguin, C., Lechner, M.C., Dufour, F., Nomine, Y., De Giorgi, M., Frisch, B., Mischeau, O., Guichard, G., Altschuh, D., and Fournel, S. (2018) Relationship between the agonist activity of synthetic ligands of TRAIL-R2 and their cell surface binding modes, *Oncotarget*, **9**, 15566–15578, doi: 10.18632/oncotarget.24526.
  25. Zhang, M., Wang, Z., Chi, L., Sun, J., and Shen, Y. (2018) Enhanced production of soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in *Escherichia coli* using a novel self-cleavable tag system Fh8-ΔI-CM, *Protein Expr. Purif.*, **148**, 16–23, doi: 10.1016/j.pep.2018.03.005.
  26. Malyala, P., and Singh, M. (2008) Endotoxin limits in formulations for preclinical research, *J. Pharm. Sci.*, **97**, 2041–2044, doi: 10.1002/jps.21152.
  27. Herbst, R.S., Eckhardt, S.G., Kurzrock, R., Ebbinghaus, S., O’Dwyer, P.J., Gordon, M.S., Novotny, W., Goldwasser, M.A., Tohnya, T.M., Lum, B.L., Ashkenazi, A., Jubb, A.M., and Mendelson, D.S. (2010) Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer, *J. Clin. Oncol.*, **28**, 2839–2846, doi: 10.1200/JCO.2009.25.1991.
  28. Gasparian, M.E., Bychkov, M.L., Yagolovich, A.V., Kirpichnikov, M.P., and Dolgikh, D.A. (2017) The effect of cisplatin on cytotoxicity of anticancer cytokine TRAIL and its receptor-selective mutant variant DR5-B, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **477**, 385–388, doi: 10.1134/S1607672917060114.
  29. Soria, J.C., Smit, E., Khayat, D., Besse, B., Yang, X., Hsu, C.P., Reese, D., Wiezorek, J., and Blackhall, F. (2010) Phase Ib study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.*, **28**, 1527–1533, doi: 10.1200/JCO.2009.25.4847.

## A NEW EFFICIENT METHOD FOR PRODUCTION OF THE RECOMBINANT ANTITUMOR CYTOKINE TRAIL AND ITS RECEPTOR-SELECTIVE VARIANT DR5-B

A. V. Yagolovich<sup>1,2</sup>, A. A. Artykov<sup>1,2</sup>, D. A. Dolgikh<sup>1,2</sup>, M. P. Kirpichnikov<sup>1,2</sup>, and M. E. Gasparian<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia; E-mail: marine\_gasparian@yahoo.com

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia

Received December 19, 2018

Revised February 25, 2019

Accepted February 26, 2019

Cytokine TRAIL induces apoptosis in tumor cells of various origins, without affecting normal cells. Clinical trials of TRAIL-receptors’ (DR4 and DR5) agonists (recombinant TRAIL or death receptors antibodies) have largely failed because most human tumors were resistant to them. Currently, a second generation of agents targeted at TRAIL-R with increased efficiency has been developed. To this end, we have developed DR5-B, a version of TRAIL selectively interacting with DR5. We have developed a new efficient method for production of TRAIL and DR5-B using expression of these proteins in *Escherichia coli* strain SHuffle B. The proteins were isolated from the cytoplasmic fraction of cells and purified to a high degree of homogeneity using metal affinity and ion exchange chromatography. The protein yield was 211 and 173 mg from one liter of cell culture for DR5-B and TRAIL, respectively, which significantly exceeded the results obtained using other methods. The DR5-B more efficiently and rapidly killed tumor cells of different origin compared with TRAIL. The resulting preparations can be used for the study of TRAIL signaling pathways and in preclinical and clinical trials as antitumor agents.

**Keywords:** cytokine TRAIL, mutant variant DR5-B, strain *E. coli* SHuffle B, cancer therapy