

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 615.371.072.074

©Коллектив авторов

### ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ HSP70 ЧЕЛОВЕКА С ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫМИ ПЕПТИДАМИ

**В.А. Черников<sup>1\*</sup>, Н.В. Гороховец<sup>2,3</sup>, Л.В. Савватеева<sup>2,3</sup>, С.Е. Северин<sup>2,4</sup>**

<sup>1</sup>НИИ Уронефрологии и репродуктивного здоровья человека ГБОУ ВПО  
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва:

эл. почта: vladimir-chernikov@rambler.ru

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва

<sup>3</sup>НИИ Молекулярной медицины ГБОУ ВПО

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

<sup>4</sup>Кафедра биологической химии ГБОУ ВПО

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

Молекулярные шапероны семейства HSP70 (70 kDa heat shock proteins) принимают участие в презентации экзогенных антигенных пептидов антиген-представляющими (антиген-презентирующими) клетками. Комплексы HSP70 с опухолеассоциированными пептидами являются мощными иммунотерапевтическими агентами, индуцирующими адаптивный цитотоксический Т-клеточный иммунный ответ. Проведённые клинические испытания показали высокую эффективность и безопасность аутологичных противоопухолевых HSP-основанных вакцин. Однако, получение таких препаратов в необходимых для применения количествах не всегда возможно, что привело к использованию рекомбинантных белков человека HSP70 для нагрузки их опухолеассоциированными пептидами *in vitro*. В нашей работе мы исследовали механизм связывания рекомбинантных HSC70 и HSP70<sub>HUB</sub> человека с антигенными пептидами различного происхождения и выявили оптимальные условия процесса комплексообразования. Предложенный метод получения комплексов позволяет увеличить репертуар связываемых HSP70 пептидов по сравнению с образующимися *in vivo* комплексами.

**Ключевые слова:** белок теплового шока, HSP70, опухолеассоциированный антигенный пептид, связывание пептидов.

**ВВЕДЕНИЕ.** Одним из наиболее динамично развивающихся подходов к лечению злокачественных новообразований является иммунотерапия, предполагающая подавление роста опухоли за счёт индукции цитотоксических лимфоцитов, специфичных к антигенам опухоли. Необходимым условием получения специфического клеточного иммунного ответа является представление специализированными антиген-презентирующими клетками (АПК) опухолевых антигенов нативным CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам, путем кросс-презентации – процессу, заключающемуся в способности АПК презентировать экзогенные антигены в составе МНС-I [1, 2]. Показано, что наибольшей иммуногенностью обладают выделенные из опухолевых клеток белковые фракции с молекулярной массой около 70 и 90 кДа, за счет присутствия в них комплексов пептидных опухолевых антигенов с белками теплового шока HSP70, HSP90 и gp96 [3].

\* - адресат для переписки

## ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ HSP70 С ПЕПТИДАМИ

Внутри клеток белки теплового шока выполняют шаперонные функции и потому способны образовывать комплексы с широким спектром пептидов. Попадая во внутренние среды организма в результате активной секреции при стрессовых условиях или после гибели клеток, комплексы пептидов с HSP могут быть захвачены антиген-презентирующими клетками путём эндоцитоза, опосредуемого рецепторами CD91 и CD40, и включены в механизм кросс-презентации антигенов [4].

Клинические испытания вакцин [5], созданных на основе HSP, демонстрируют их высокую безопасность при достаточно большой дисперсии эффективности, которая может быть объяснена не только иммуносупрессорным влиянием опухоли, но и факторами, связанными с технологией получения препаратов. Наиболее перспективным подходом представляется создание аутологичных вакцин на основе выделенных из опухоли комплексов антигенных пептидов с HSP70 и gp96, обусловленный присутствием уникальных для конкретной опухоли антигенов. Однако основной проблемой аутологичных вакцин является зависимость количества выделяемого материала от размеров опухоли. До 50% пациентов исключается из клинических испытаний по причине невозможности выделения достаточного для иммунизации количества вакцины [5]. Повышение концентрации шаперонов внутри клетки связано с воздействием на неё стрессовых факторов различной природы [6], что может отражаться на степени нагрузки HSP70 антигенами и сужать спектр пептидов, образующих стойкие комплексы с данным белком *in vivo*. Неполная передача антигенного репертуара опухоли, вероятно, также может влиять на высокую дисперсию эффективности, характерную для аутологичных вакцин. Преодолеть указанные проблемы возможно путем использования рекомбинантных HSP70 человека и разработки методики нагрузки HSP70 антигенами, выделяемыми из пептидной фракции лизата клеток аутологичной опухоли *in vitro*.

Ранее нами были исследованы функциональные характеристики рекомбинантных белков теплового шока семейства HSP70: индуцибельного HSP70<sub>A1B</sub>, конститутивного HSC70, а также двух гибридных белков, отличающихся составом доменов [9]. Показано определяющее влияние АТР-азного домена на спектр пептидов, предпочтительно связывающихся с С-концевым доменом. Результаты исследования показали, что пара рекомбинантных белков HSP70<sub>HYB</sub> и HSC70 является наиболее оптимальной для создания стандартизуемой вакцины. Данная работа посвящена исследованию влияния различных факторов на образование комплексов антигенов с HSP70<sub>HYB</sub> и HSC70 и разработке методики получения пептидных комплексов с рекомбинантными HSP70 *in vitro* для создания противоопухолевых вакцин.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали реактивы фирм “Sigma” (США), “Merck” (Германия); пептиды синтезированы FMOC-твердофазным методом в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

*Получение рекомбинантных белков теплового шока.* Экспрессионные плазмиды и штаммы-продуценты рекомбинантных HSP70 получены ранее [7, 9]. Нарращивание биомассы штаммов-продуцентов и выделение рекомбинантных белков HSP70<sub>HYB</sub>, HSC70 проводили по описанной ранее методике [7, 8].

*Определение АТРазной активности HSP70.* АТРазную активность полученных рекомбинантных белков тестировали по их способности гидролизовать АТР колориметрическим методом по накоплению в реакционной смеси неорганического фосфата [9].

*Получение пептидных фракций лизатов опухолевых клеток.* Клетки лимфомы Беркитта линии Raji культивировали в среде RPMI 1640 (“Sigma”, США) с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (“Gibco”, США) и 50 мкг/мл гентамицина (“Панэко”, Россия) в увлажненной среде при температуре 37°C в CO<sub>2</sub> инкубаторе при содержании CO<sub>2</sub> 5%. Клетки осаждали центрифугированием (478 g, 3 мин, 4°C) и отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS, “Sigma”, США).

Далее к осадкам клеток ( $6 \times 10^7$ ) добавляли 350 мкл лизирующего буфера (10 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 7,5, 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM EDTA, 2 mM PMSF) и гомогенизировали ультразвуком в течение 1 мин. Клеточную суспензию осаждали центрифугированием (17200 g, 15 мин,  $4^\circ\text{C}$ ). Растворимую фракцию клеточных белков подвергали ультрафильтрации на ячейке Amicon Ultra-4 Ultracel-10 kDa ("Millipore", США) для отделения свободных пептидов с молекулярной массой не более 10 кДа. Далее выделяли фракцию связанных с клеточными HSP70 эндогенных пептидов путём инкубации сконцентрированной растворимой фракции клеточных белков в 500 мкл лизирующего буфера с добавлением 10 mM АТР и 2 mM  $\text{MgCl}_2$  в течение 1 ч при  $37^\circ\text{C}$  и последующей ультрафильтрацией. Аналогичным способом получали фракцию пептидов, связанных с клеточными HSP90, gp96 и МНС путём экстракции 0,1% раствором ТХУ в течение 1 ч при  $4^\circ\text{C}$  [10]. Собранные пептидные фракции упаривали на роторном испарителе досуха и растворяли в 200 мкл бикарбонатного буфера (0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8,6). Концентрацию пептидов в растворе измеряли с использованием набора ВСА ("Sigma", США) с интерпретацией значений оптической плотности с помощью калибровочной кривой, построенной для синтетического пептида вирусного гепатита NS5. К раствору пептидной фракции добавляли раствор флуоресцеинизотиоцианата (FITC) в ДМСО (10 мг/мл) из расчёта 0,4 мкг FITC на 1 мкг пептидной фракции в конечном объёме 1 мл, смесь инкубировали при интенсивном перемешивании в течение 2 суток при температуре  $4^\circ\text{C}$ . Реакцию останавливали добавлением 1 мл буферного раствора 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5. Затем смесь упаривали на роторном испарителе до 100 мкл.

*Получение комплексов рекомбинантных HSP70 с пептидами.* Реакцию комплексообразования рекомбинантных HSP70<sub>НУВ</sub> и HSC70 с мечеными FITC синтетическими антигенными пептидами проводили по разработанной нами ранее методике [9]. Комплексы смеси меченого и немеченого синтетических пептидов (1:1) с исследуемыми белками получали путём совместной инкубации 5-, 10- и 20-кратного избытка пептидной смеси с 40 мкг каждого белка в фосфатно-солевых буферных растворах с pH 8,0 и pH 6,0 в течение 60, 120 и 180 мин в присутствии 1мM ADP с последующим удалением несвязавшихся пептидов методом металло-хелатной хроматографии [9]. Количество связавшегося меченого FITC пептида определяли по оптическому поглощению при длине волны 495 нм. Средние значения определяли по результатам 3-х независимых экспериментов.

Комплексы выделенных из лизата опухолевых клеток меченых FITC пептидов (менее 10 кДа) с HSP70<sub>НУВ</sub> и HSC70 получали путём совместной инкубации 10 и 40 мкг пептидной фракции с 40 мкг белка в буферных растворах pH 8,0 и pH 6,0 в течение суток в присутствии 1-3 мM ADP. Образовавшиеся комплексы отделяли от несвязавшихся пептидов ультрафильтрацией, затем разрушали их, добавляя АТР до конечной концентрации 25 мM. Раствор наносили на картридж C<sub>18</sub>6cc (объём 1 мл, "Waters", США), промывали 10 мл 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5 и элюировали пептиды 4 мл смеси растворителей 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5 – ацетонитрил (1:3). Элюат упаривали на роторном испарителе досуха, затем растворяли в 200 мкл 0,1% ТХУ. Состав полученного раствора анализировали методом обратно-фазной ВЭЖХ (колонка C<sub>18</sub>, 4,6×250 мм, "Phenomenex", США). Пептиды элюировали градиентом (0-100%) растворителей 0,1% ТХУ – ацетонитрил. Детекцию проводили при длине волны 495 нм.

*Определение кинетических параметров связывания белков с пептидами.* Зависимость концентрации комплексов от времени совместной инкубации, а также значения  $K_d$  (равновесная константа диссоциации комплексов),  $k_{\text{обр}}$  и  $k_{\text{дисс}}$  (константы скоростей образования и диссоциации комплексов) определяли путём решения соответствующих уравнений, описанных ранее [9]. Все эксперименты проводили с двумя повторами (итого по 3 измерения на точку).

*Статистическая обработка и анализ данных.* Статистическую обработку и анализ данных проводили с использованием ПО Origin Pro 8.0 и Statistica 7.0.

## ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ HSP70 С ПЕПТИДАМИ

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

*Характеристика рекомбинантных белков теплового шока человека и пептидов.* Рекомбинантные HSC70 и HSP70<sub>HУВ</sub>, различающиеся первичной структурой АТРазного домена, были получены с использованием описанных ранее методов [7]. HSP70<sub>HУВ</sub> содержит N-концевой АТРазный домен индуцибельного белка, являющегося продуктом экспрессии гена *HSPA1B*, и пептид-связывающий домен конститутивно экспрессирующегося белка, являющегося продуктом экспрессии гена *HSPA8* [9].

Ранее нами было показано, что исследуемые белки обладают различной субстратной специфичностью, но АТРазная активность одинаково зависит от количества связанного с HSP70 пептида [9], и оптимальными являются рекомбинантные HSP70<sub>HУВ</sub> и HSC70 для получения квазиаутологичных противоопухолевых вакцин, стандартизованных по АТРазной активности.

В исследовании пептид-связывающей активности исследуемых белков нами были использованы представляющие потенциальный интерес для создания противоопухолевых и противовирусных вакцин HLA-A2 рестриктированные пептиды (таблица). На основании констант диссоциации К<sub>д</sub> определенных для каждой пары пептид-белок, пептиды можно ранжировать по увеличению аффинности к HSP70<sub>HУВ</sub> в следующем порядке: E7 < gp100 < PSMA < HCV2a < NS5. Для HSC70 ряд увеличения аффинности пептидов выглядит следующим образом: HCV2a < NS5 < E7 < gp100 [9].

*Таблица.* Структура и физико-химические свойства пептидов, использованных в исследовании; GRAVY (grand average of hydropathicity) - индекс гидрофильности.

Название	Происхождение	Структура	Свойства	
			pI	GRAVY
<b>E7</b>	<b>Папилломавирус человека</b>	<b>YMLDLQPETT</b>	<b>3,6</b>	<b>1,3</b>
<b>gp100</b>	<b>Меланома</b>	<b>ITDQVPFSV</b>	<b>3,8</b>	<b>0,6</b>
<b>HCV2a</b>	<b>Вирус гепатита С</b>	<b>YLLPRRGPR</b>	<b>11,7</b>	<b>-0,7</b>
<b>NS5</b>	<b>Вирус гепатита С</b>	<b>VVLDSLDPMV</b>	<b>3,7</b>	<b>-0,5</b>
<b>PSMA</b>	<b>Рак простаты</b>	<b>ALFDIESKV</b>	<b>5,3</b>	<b>0,2</b>

*Влияние температуры, pH и концентрации ADP на связывание HSC70 и HSP70<sub>HУВ</sub> с синтетическими пептидами.* Для изучения влияния температуры на эффективность образования пептидных комплексов меченый пептид инкубировали с HSP70<sub>HУВ</sub> при температуре 4, 15, 25, 37 и 50°C. На рисунке 1А приведены данные для синтетического пептида NS5, обладающего наиболее высокой аффинностью из всех исследованных нами. Максимальное количество комплексов образовывалось при температуре 25°C. Полученные результаты соответствуют данным зарубежных публикаций, в которых отмечается наиболее легкий переход из “открытой” R-конформации в “закрытую” T-конформацию, стабилизирующую комплекс с пептидом, при температуре 25°C [15]. Аналогичный эксперимент, проведенный с необработанным АТР HSP70<sub>HУВ</sub> (то есть неочищенным от бактериальных пептидов), показал существенное снижение эффективной нагрузки рекомбинантных HSP70 пептидами *in vitro*. Объясняется это, во-первых, отличной от нативной конформацией белка, обусловленной отсутствием в АТРазном центре какого-либо нуклеотида, и, во-вторых, наличием в препарате HSP70<sub>HУВ</sub> до 4% комплексов с высоко аффинными бактериальными пептидами, которые вытесняют исследуемый пептид из состава комплексов [8].

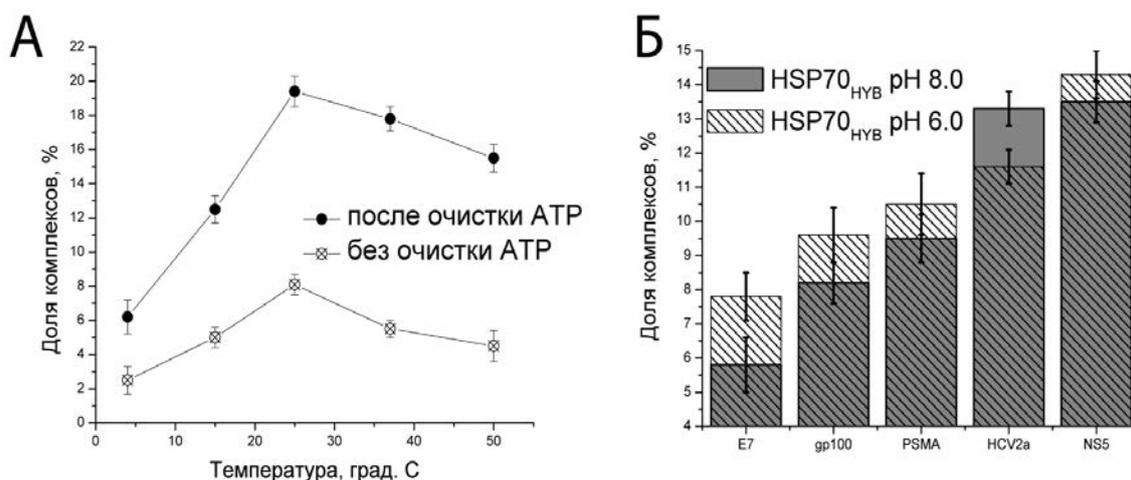


Рисунок 1.

Влияние температуры (А) и значения величины рН (Б) на количество образующихся комплексов HSP70<sub>HYB</sub> с пептидами NS5 (А и Б) и E7, gp100, PSMA, HCV2a (Б) после 60 (А) и 30 (Б) минут инкубации.

В ряде исследований было продемонстрировано, что белки семейства HSP70 предпочтительно связывают неполярные пептидные последовательности [16-19], поэтому для исследования влияния рН среды нами были выбраны 2 значения рН – 6,0 и 8,0, при которых большинство МНС-рестриктированных пептидов “кислой” и “основной” групп обладают наименьшей ионизацией [20]. Было показано, что при значении рН 6,0 связывание пептидов “кислой” группы (E7, gp100, PSMA, NS5) усиливается, тогда как пептид “основной” группы (HCV2a) лучше образует комплексы при рН 8,0 (рис. 1Б). Следует отметить, что влияние сдвига рН среды на повышение аффинности пептида к HSP70<sub>HYB</sub> было тем заметнее, чем выше его гидрофильность.

Для оценки влияния ADP на процесс комплексообразования был проведён ряд кинетических экспериментов. Рекombинантные белки HSP70<sub>HYB</sub> и HSC70 инкубировали с 5-кратным избытком пептида в присутствии 1-5 мМ ADP в течение 2 ч. Содержание комплексов определяли через каждые 30 мин. На основе полученных экспериментальных данных были определены зависимости констант скоростей образования комплексов и равновесных констант диссоциации комплексов HSC70 и HSP70<sub>HYB</sub> (рис. 2) с мечеными FITC пептидами. Расчёт соответствующих констант был проведен на основе эмпирически определенных коэффициентов экспоненциальных уравнений, описывающих зависимость насыщения рекombинантных белков пептидами от времени инкубации.

Было показано, что повышение концентрации ADP в среде увеличивает константу скорости образования комплексов рекombинантных HSC70 и HSP70<sub>HYB</sub> со всеми исследованными пептидами. При этом было отмечено более сильное влияние изменения концентрации ADP на константу скорости образования комплексов с высоко аффинными пептидами. Свидетельством данного факта является увеличение углового коэффициента сглаживающих прямых соответствующих зависимостей при увеличении аффинности пептидов (рис. 2А,Б).

Константа диссоциации комплексов с исследованными пептидами при повышении концентрации ADP снижалась в случае HSC70, но не HSP70<sub>HYB</sub> (рис. 2В,Г). Гибридный белок характеризовался увеличением равновесной константы диссоциации комплексов со всеми исследованными пептидами при одновременном увеличении константы скорости образования комплексов.

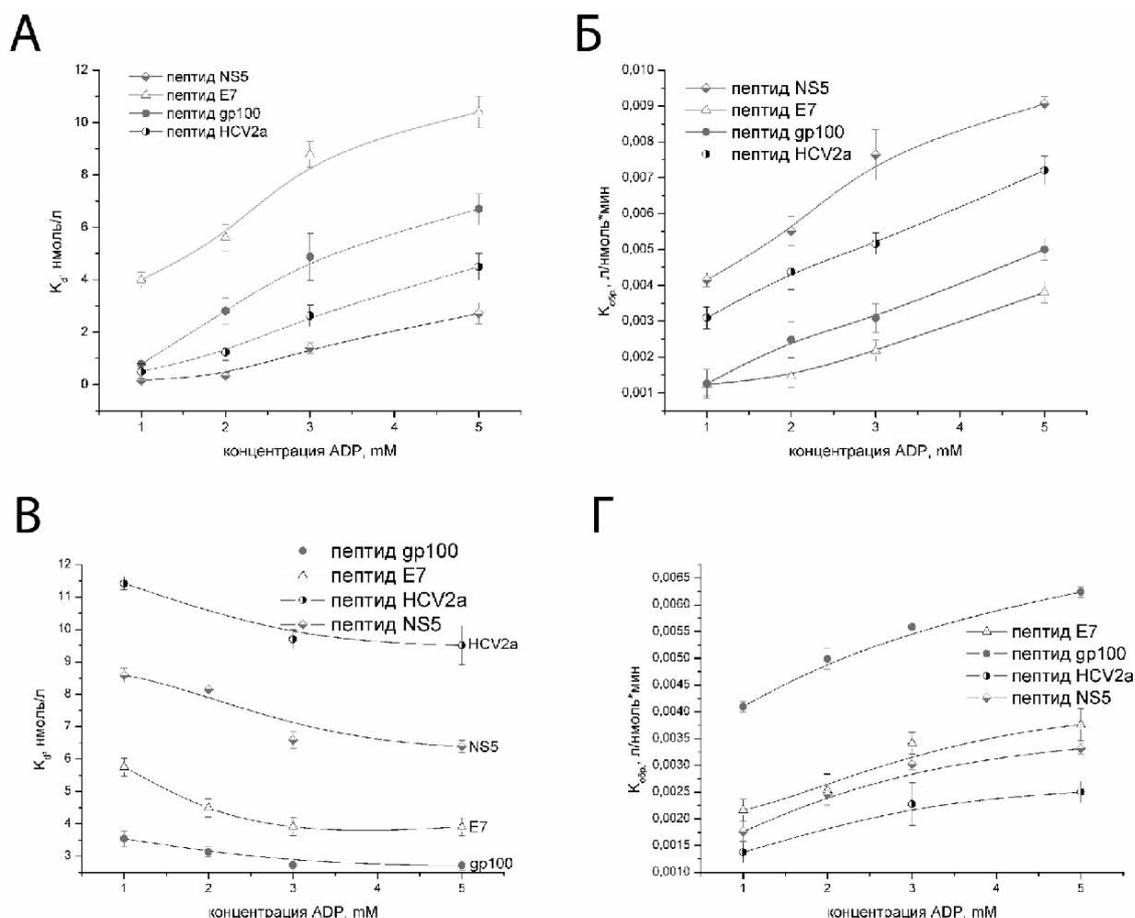


Рисунок 2.

Зависимость констант скоростей образования комплексов HSC70 (А) и HSP70HYB (Б) и равновесных констант диссоциации комплексов (В - HSC70, Г - HSP70HYB) с исследуемыми пептидами от концентрации ADP.

Сопоставляя полученные данные о динамике образования комплексов, можно сделать вывод о том, что не только АТФ, но и АDР, как нуклеотидный фактор, способствует ускорению взаимодействий белков семейства HSP70 с пептидами, индуцируя конформационные изменения в АТФ-азном домене, что, по-видимому, приводит к облегчению взаимодействия пептида с HSP70. В случае с HSC70 молекулы АDР выполняют двойную функцию: индуцируют конформационные изменения, облегчающие взаимодействие с пептидами и стабилизируют “закрытую” конформацию субстрат-связывающего домена, обеспечивающую высокую стойкость пептидных комплексов.

Увеличение константы диссоциации комплексов рекомбинантного белка HSP70<sub>HYB</sub> при повышении концентрации АDР на фоне повышения константы скорости реакции образования комплексов говорит об ускорении распада комплексов. Это может свидетельствовать об изменении характера взаимодействий между доменами.

*Взаимодействие HSP70 со смесью пептидов.* Физико-химические характеристики элюированных из комплексов с HSP70 пептидов, образовавшихся *in vivo*, показывают, что входящий в состав аутологических вакцин HSP70 не может полностью передать антигенный репертуар опухоли [9]. Одной из причин этого, по-видимому, является характер влияния повышения концентрации АDР на скорость образования комплексов HSP70 с пептидами различной аффинности.

Как уже было показано, повышение концентрации ADP особенно усиливает образование комплексов с высоко аффинными пептидами, вследствие чего пептиды, обладающие низкой аффинностью, исключаются из состава комплексов.

Обнаружение зависимости АТРазной активности от доли комплексов в препарате HSP70 [8] сделало возможным проведение экспериментов со смесью меченого и немеченого пептидов, обладающих разной аффинностью к исследуемым белкам, что позволяет смоделировать нагрузку HSP70 смесью неизвестных пептидов. Для этого нами были подготовлены 3 смеси, содержащие один из меченых FITC пептидов - NS5, E7 или gp100 и немеченый пептид PSMA в молярном соотношении 1:1. Белок HSP70<sub>НУВ</sub> инкубировали с 5-, 10- и 20-кратным молярным избытком каждой из данных смесей в течение 2 ч. Количество образовавшихся комплексов белок-пептидная смесь определяли по АТРазной активности препаратов, а комплексов белок-меченый пептид – по оптическому поглощению FITC при длине волны 495 нм. В результате было показано, что высоко аффинные пептиды обладают способностью вытеснять низко аффинные из состава комплексов с HSP70<sub>НУВ</sub> при повышении общего соотношения пептидная смесь : HSP70 (рис. 3).

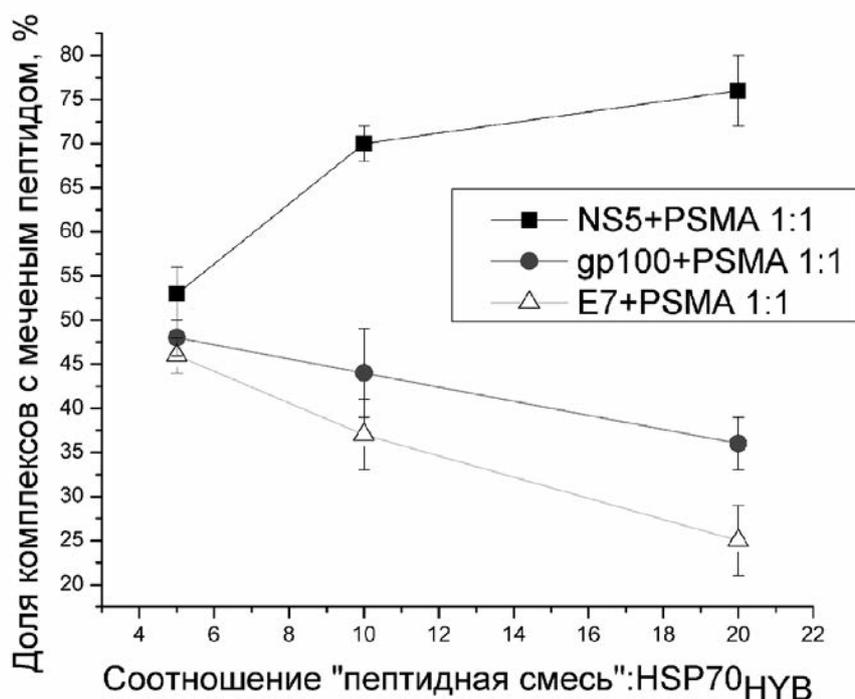


Рисунок 3.

Зависимость доли комплексов HSP70<sub>НУВ</sub>-пептидная смесь, образованных пептидами различной аффинности (NS5, gp100, E7) в эквимольной смеси с пептидом PSMA после 2 ч инкубации, от общего молярного соотношения пептидная смесь:HSP70. Аффинность пептидов убывает в ряду NS5 >PSMA >gp100> E7.

Таким образом, в ходе работы было выявлено как минимум два механизма, обуславливающих дискриминацию при связывании пептидов *in vivo*. Это высокое соотношение субстрат : HSP70 и высокая концентрация ADP в среде. Внутри эукариотической клетки на связывание субстрата с HSP70 значительное влияние оказывает присутствие ко-шаперона HSP40, который обладает отличной от HSP70 субстратной специфичностью [21], а также способен модулировать пептид-связывающую активность последнего [22]. Показано, что бактериальный аналог HSP40 (DnaJ) снижает сродство DnaK к гидрофобным пептидам, повышая

## ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ HSP70 С ПЕПТИДАМИ

степень связывания с пептидами, содержащими положительно заряженные аминокислоты (Arg, Lys). Однако экспрессия генов ко-шаперонов HSP40 не индуцируется при стрессе [23] в отличие от ряда генов, экспрессирующих HSP70, что позволяет предположить возникновение дисбаланса шаперонов при стрессе, приводящего к сужению спектра связываемых HSP70 пептидов.

*Анализ состава пептидной фракции лизатов опухолевых клеток при взаимодействии с HSP70.* Для подтверждения результатов, полученных на модельных смесях, и гипотез, предложенных в ходе теоретического анализа данных, мы исследовали закономерности образования комплексов рекомбинантных HSP70 с пептидной фракцией лизатов опухолевых клеток лимфомы Беркитта линии Raji. В данных экспериментах нас интересовало не только общее количество комплексов, но и разнообразие пептидов, оставшихся в составе комплекса после его очистки. Для количественного и качественного анализа пептидов, элюированных из комплексов с HSP70<sub>НУВ</sub> и HSC70, был использован метод ВЭЖХ на колонке C<sub>18</sub>. Поскольку детекция положения пиков пептидов при 214 нм была затруднена вследствие малой специфичности данной длины волны для пептидной связи, было принято решение ввести FITC в состав пептидов, находящихся в пептидной фракции клеточного лизата, что гарантирует специфичность и повышение чувствительности детекции. Для того чтобы снизить вероятность присоединения нескольких молекул FITC к одной и той же молекуле пептида реакцию введения метки проводили в условиях кинетического контроля, то есть в течение длительного времени на холоде, после чего реакцию останавливали.

Растворимая фракция лизата клеток линии Raji была профильтрована через мембрану, пропускающую частицы с размером не более 10 кДа. Фильтрат подвергали введению метки FITC. Отдельно были элюированы пептиды, захваченные HSP70 *in vivo*, а также пептиды, находившиеся в комплексе с HSP90, gp96 и MHC-I, которые также конъюгировали с FITC. Для анализа этих пептидов также был использован метод ВЭЖХ на колонке C<sub>18</sub>. Результаты хроматографии приведены на рисунке 4.

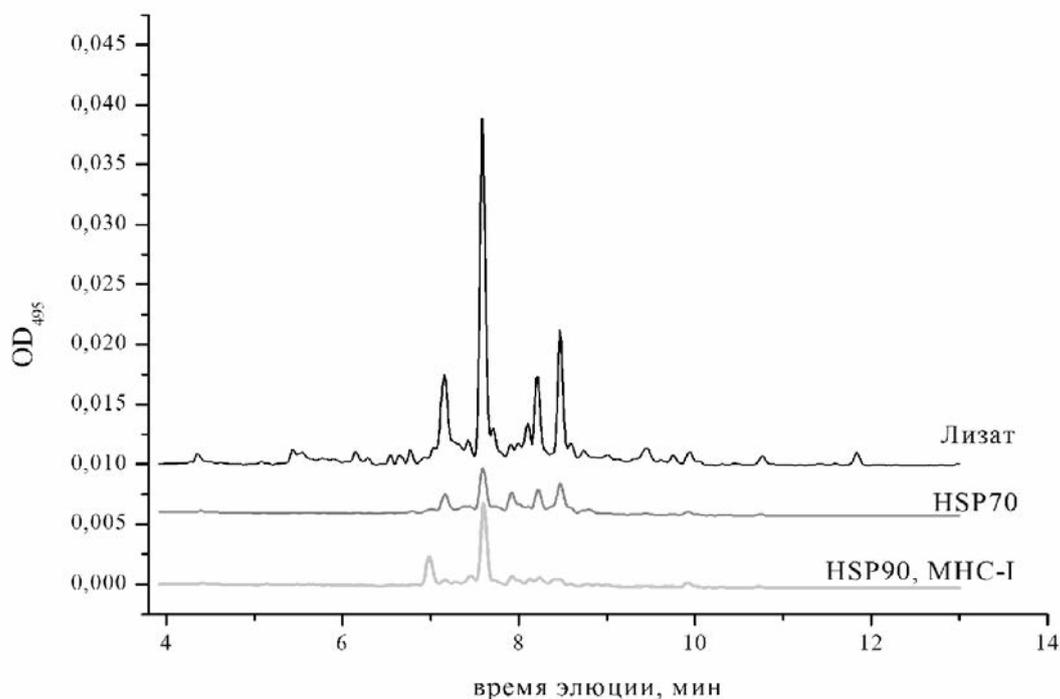


Рисунок 4.

Хроматограмма низкомолекулярной (менее 10 кДа) фракции лизата опухолевой линии Raji (лизат), пептидов, элюированных из клеточных комплексов с HSP70 и MHC-I, gp96 и HSP90.

Оказалось, что количество свободных пептидов, выделенных из 60 млн клеток лимфомы Беркитта линии Raji превышает количество пептидов, находящихся в комплексах с HSP70, HSP90, gp96 и MHC-I, элюированных из такого же количества клеток.

Несмотря на то, что точный состав пептидов установлен не был, по хроматограмме элюированных пептидов можно констатировать, что состав свободной пептидной фракции более разнообразен, чем состав пептидов, связанных с HSP90, gp96 и MHC-I. В то же время, в комплексах с этими белками могут находиться такие пептиды, которые отсутствуют в клетках в свободном виде.

Таким образом, предположение о возможности снизить необходимый для выделения достаточного количества аутологичной вакцины объём изолируемой у пациента опухоли за счёт использования свободной пептидной фракции является вполне обоснованным. Несмотря на отсутствие данных об иммуногенности фракций свободных опухолевых пептидов, можно также предполагать возможность расширения передаваемого антигенного репертуара за счёт получения комплексов HSP70 с ними *in vitro*. Этот эксперимент демонстрирует также необходимость оптимизации не только методики нагрузки рекомбинантных HSP70<sub>HYB</sub> и HSC70 *in vitro*, но и методики выделения пептидов из лизатов опухолевых клеток.

Эксперименты по нагрузке рекомбинантных HSP70 пептидной фракцией лизата показали расширение спектра связываемых HSP70 пептидов по сравнению с пептидами, элюированными из комплексов с HSP70, образовавшихся *in vivo* (рис. 4, 5). Этот факт подтверждает справедливость предположения, что избирательность связывания HSP70 с пептидами *in vivo* является результатом создания внутри клеток специфических условий, оптимальных, по-видимому, для выполнения шаперонной функции, но не для получения иммунотерапевтических препаратов.

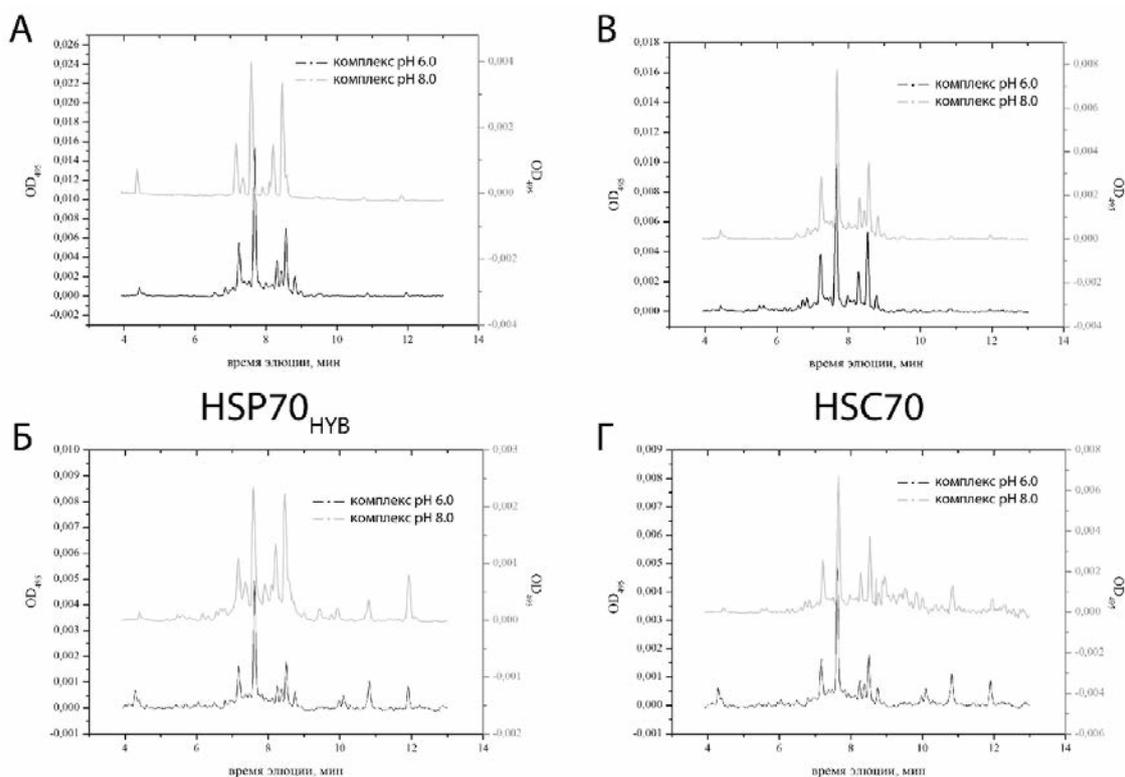


Рисунок 5.

Хроматограмма пептидов, элюированных из комплексов с HSP70<sub>HYB</sub> (А, Б) и HSC70 (В, Г), полученных после инкубации 40 мкг белка в течение 24 ч с 40 мкг пептидной фракции лизата (А, В) и 10 мкг пептидной фракции лизата (Б, Г) при рН 6,0 (комплекс рН 6,0) и рН 8,0 (комплекс рН 8,0).

## ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ HSP70 С ПЕПТИДАМИ

Некоторые различия были отмечены в спектре пептидов, связываемых при значениях pH 6,0 и 8,0 как при высоком (рис. 5А,В) так и при низком (рис. 5Б,Г) соотношении пептид : белок для HSP70<sub>НУВ</sub> (рис. 5А,Б) и HSC70 (рис. 5В,Г). Также показаны различия в спектре связываемых пептидов между HSP70<sub>НУВ</sub> (рис. 5 Б) и HSC70 (рис. 5Г), которые были наиболее выражены при нагрузке белков небольшим избытком пептида.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.

1. Разработана методика получения рекомбинантных HSC70 и HSP70<sub>НУВ</sub>, представляющих потенциальный интерес для создания стандартизируемых аутологичных вакцин.

2. Установлены основные параметры, определяющие степень связывания пептидов с белками семейства HSP70 (концентрация ADP, температура и pH среды, соотношение пептидов и HSP70, типы белков) и предложен оптимизированный метод получения комплексов пептидов с рекомбинантными HSP70 *in vitro*.

3. Показано, что спектр низкомолекулярных пептидов лизатов опухолевых клеток, связываемых рекомбинантными HSP70<sub>НУВ</sub> и HSC70, зависит от условий образования комплексов *in vitro* (pH среды, молекулярное соотношение компонентов).

Работа выполнена при государственной поддержке молодых российских учёных по гранту № МК-516.2011.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Pockley A.G. (2003) *Lancet*, **9**, 469-476.
2. Vyas J.M., Van der Veen A.G., Ploegh H.L. (2008) *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 607-618.
3. Ishii T., Udono H., Yamano T., Ohta H., Uenaka A., Ono T., Hizuta A., Tanaka N., Srivastava P.K., Nakayama E. (1999) *J. Immunol.*, **162**, 1303-1309.
4. Basu S., Binder R.J., Ramalingam T., Srivastava P.K. (2001) *Immunity*, **14**, 303-313.
5. Wood C., Srivastava P., Bukowski R., Lacombe L., Gorelov A.I., Gorelov S., Mulders P., Zielinski H., Hoos A., Teofilovici F., Isakov L., Flanigan R., Figlin R., Gupta R., Escudier B. (2008) *Lancet*, **372**(9633), 145-154.
6. Schlesinger M.J. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 12111-12114.
7. Савватеева Л.В., Гороховец Н.В., Черников В.А., Данилевский М.И., Северин С.Е. (2007) *Вопр. биол. мед. фарм. химии*, **3**, 38-42.
8. Черников В.А., Гороховец Н.В., Макаров В.А., Савватеева Л.В., Северин С.Е. (2009) *Молекулярная медицина*, **1**, 49-54.
9. Черников В.А., Гороховец Н.В., Макаров В.А., Савватеева Л.В., Северин С.Е. (2011) *Мол. Биол.*, **45**, 903-913.
10. Bamford A.I., Douglas A., Friede T., Stevanovic S., Rammensee H.G., Adair B.M. (1995) *Immunol. Lett.*, **45**, 129-136.
11. Alexander M., Salgaller M.L., Celis E., Sette A., Barnes W.A., Rosenberg S.A., Steller M.A. (1996) *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **175**, 1586-1593.
12. Bredenbeck A., Losch F.O., Sharav T., Eichler-Mertens M., Filter M., Givchchi A., Sterry W., Wrede P., Walden P. (2005) *J. Immunol.*, **174**, 6716-6724.
13. Wang Y., Takao Y., Harada M., Yutani S., Ide T., Sata M., Itoh K., Yamada A. (2006) *Microbiol. Immunol.*, **50**, 857-865.
14. Robert J., Cohen N., Maniero G.D., Goyos A., Morales H., Gantress J. (2003) *Cell Mol. Biol.*, **49**, 263-275.
15. Moroi Y., Mayhew M., Trcka J., Hoe M.H., Takechi Y., Hartl F.U., Rothman J.E., Houghton A.N. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3485-3490.
16. Fourie A.M., Sambrook J.F., Gething M.J. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 30470-30478.
17. Arnaiz B., Madrigal-Estebas L., Todryk S., James T.C., Doherty D.G., Bond U. (2006) *J. Immune Based Ther. Vaccines*, **4**, 2-14.

18. Maeda H., Sahara H., Mori Y., Torigo T., Kamiguchi K., Tamura Y., Hirata K., Sato N. (2007) J. Biol. Chem., **282**, 26956-26962.
19. Grossmann M.E., Madden B.J., Gao F., Pang Y.P., Carpenter J.E., McCormick D., Young C.Y. (2004) Exp. Cell Res., **297**, 108-117.
20. Гороховец Н.В., Черников В.А., Савватеева Л.В., Северин С.Е. (2008) Вестник научно-исследовательского института молекулярной медицины, **8**, 30-51.
21. Kim S.Y., Sharma S., Hoskins J.R., Wickner S. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 44778-44783.
22. Crouy-Chanel A., Kohiyama M., Richarme G. (1996) J. Biol. Chem., **271**, 15486-15490.
23. Vos M.J., Hageman J., Carra S., Kampinga H.H. (2008) Biochemistry, **47**, 7001-7011.

Поступила: 30. 11. 2012.

#### ANALYSIS OF COMPLEX FORMATION OF HUMAN RECOMBINANT HSP70 WITH TUMOR-ASSOCIATED PEPTIDES

V.A. Chernikov<sup>1</sup>, N.V. Gorokhovets<sup>2,3</sup>, L.V. Savvateeva<sup>2,3</sup>, S.E. Severin<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Uro nephrology and Reproductive Health care, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia; e-mail: vladimir-chernikov@rambler.ru

<sup>2</sup>National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

<sup>3</sup>Research Institute of Molecular Medicine of the I. M. Sechenov First MSMU, Moscow, Russia

<sup>4</sup>Biochemistry Department, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Molecular chaperones of HSP70 family assists presentation of exogenous antigenic peptides by antigen-presenting cells (APC). HSP70-peptide complexes are powerful immunotherapeutic agents, which enhance cross-presentation of captured antigen in dendritic cells and macrophages. Several clinical trials have shown that HSP-based cancer vaccines possess good efficacy and safety. However, sometime it is impossible to isolate sufficient amount of vaccine. These make us to pay attention for recombinant HSP70-based vaccines and to optimize *in vitro* complex formation mechanism. Here we have investigated two human recombinant proteins HSP70<sub>HYB</sub> and HSC70. Optimal values of ADP concentration, pH, temperature and peptides excess are determined in this work. We have also shown that proposed complex formation method enriches eluted from HSP70-complexes peptide repertoire compared to *in vivo* assembled ones.

**Key words:** heat shock proteins, HSP70, tumor-associated antigenic peptide, peptide binding.