

УДК 576.385.5

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРА P185^{HER2} С ПОМОЩЬЮ АНТИТЕЛ, СОЕДИНЕННЫХ С ДИБАРНАЗОЙ, И КОНЬЮГАТОВ БАРСТАРА С КОЛЛОИДНЫМ ЗОЛОТОМ

© 2013 г. Ю. Л. Иванова^{1*}, Э. Ф. Эдельвейс², О. Г. Леонова¹, Т. Г. Баландин², В. И. Попенко¹, С. М. Деев²

¹Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997

Поступила в редакцию 06.12.2012 г.

Принята к печати 28.03.2013 г.

Методами световой, конфокальной и электронной иммунной микроскопии изучена локализация трансмембранного рецептора P185^{HER2} в опухолевых клетках SKOV-3 и BT-474. P185^{HER2} служит маркером злокачественных опухолей молочной железы и яичников, а также мишенью для противоопухолевой терапии. Чрезвычайно важен правильный выбор универсального иммуноцитотоксического агента, с помощью которого можно, во-первых, изучать распределение P185^{HER2} в раковых клетках, во-вторых, удалять рецептор с поверхности и, в-третьих, разрушать клетки-мишени. В представленной работе для визуализации P185^{HER2} предложена иммуноцитотоксическая система, состоящая из моноклонального миниантитела 4D5 (scFv) против внеклеточного домена P185^{HER2}, соединенного с двумя молекулами барназы – цитотоксической РНКазы из *Bacillus amyloliquefaciens*, и ее специфического ингибитора барстара. При помощи флуоресцентной микроскопии показано, что модуль 4D5 scFv-дибарназа:барстар эффективно выявляет P185^{HER2} на поверхности раковых клеток. С помощью конфокальной микроскопии установлено, что взаимодействие с 4D5 scFv-дибарназой приводит к интернализации P185^{HER2}. Электронно-микроскопически с использованием комплексов 4D5 scFv-дибарназа:барстар-Au и 4D5 scFv-дибарназа-Au проведена сравнительная локализация P185^{HER2} в клетках рака яичников (SKOV-3) и молочной железы (BT-474) человека. На поверхности клеток P185^{HER2} распределен неравномерно, располагаясь преимущественно на выростах, у их основания и в местах контакта выростов с телом клетки. При температуре 37°C P185^{HER2} интернализуется через окаймленные ямки и везикулы и в клетках обеих линий концентрируется в эндосомах и мультивезикулярных тельцах, а в клетках BT-474 также в лизосомах.

Ключевые слова: P185^{HER2}, 4D5 scFv, барназа, барстар, иммунная электронная микроскопия.

IMMUNOCYTOCHEMICAL VISUALIZATION OF P185^{HER2} RECEPTOR BY ANTIBODY FUSED WITH DIBARNASE AND CONJUGATE OF BARSTAR WITH COLLOIDAL GOLD, by J. L. Ivanova^{1*}, E. F. Edelweiss², O. G. Leonova¹, T. G. Balandin², S. M. Deyev², V. I. Popenko¹ (¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia, ²Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia; *e-mail: ivajul@mail.ru). We studied the localization of transmembrane receptor P185^{HER2} in SKOV-3 and BT-474 cancer cells by fluorescence, confocal and electron immunomicroscopy. P185^{HER2} is a marker of breast and ovarian tumors, it is considered as a target for anticancer therapy. It is extremely important to choose a universal immunocytotoxic agent applicable, first, to study the distribution of P185^{HER2} in cancer cells, secondly, to remove P185^{HER2} from the cell surface and, thirdly, to eliminate target cells. In this work for visualization of P185^{HER2} we proposed immunocytotoxic system, consisting of the monoclonal miniantibody 4D5 scFv to extracellular P185^{HER2} domain fused with two molecules of barnase (ribonuclease from *Bacillus amyloliquefaciens*) and of its specific inhibitor barstar. Fluorescence microscopy has showed that the module 4D5 scFv-dibarnase:barstar efficiently identified P185^{HER2} on the surface of cancer cells. It was revealed by confocal microscopy that interaction with 4D5 scFv-dibarnase lead to internalization of P185^{HER2}. The localization of P185^{HER2} in human ovarian carcinoma cells SKOV-3 and breast carcinoma cells BT-474 was compared by electron microscopy using 4D5 scFv-dibarnase:barstar-Au and 4D5 scFv-dibarnase-Au complexes. P185^{HER2} distributed on the cell surface

Принятые сокращения: ФБ – фосфатный буфер; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; БСА – бычий сывороточный альбумин; GAR-FITC – козы антикриоличы антитела, конъюгированные с флуоресцеинизотиоцианатом; GAR-TR – козы антикриоличы поликлональные антитела, конъюгированные с красителем Texas Red; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста.

* Эл. почта: ivajul@mail.ru

unequally with preferential localization on protrusions or close to their bases and in contacts between protrusions and cell membrane. At 37°C, P185^{HER2} internalized through coated pits and vesicles and concentrated in the endosomes and multivesicular bodies in the cells of both cell lines, as well as in lysosomes in cells BT-474.

Keywords: P185^{HER2}, 4D5 scFv, barnase, barstar, immune electron microscopy.

DOI: 10.7868/S0026898413050066

Белок P185^{HER2} — трансмембранный рецептор, цитоплазматический домен которого обладает тирозинкиназной активностью. Он принадлежит к семейству EGF-рецепторов, отвечающих на стимуляцию факторами роста [1] и вовлеченных в процессы клеточного роста и дифференцировки [2]. Специфический лиганд для P185^{HER2} не найден. Известно, что P185^{HER2} способен формировать гетеродимеры с гомологичными рецепторами, в частности, с EGFR (рецептором эпидермального фактора роста) [3, 4], что приводит к их взаимному перераспределению [5, 6], изменению активности EGFR [7], снижению скорости его эндоцитоза [2, 4] и амплификации митогенного сигнала [8].

Повышенная экспрессия P185^{HER2} обнаружена на поверхности клеток 30–50% злокачественных опухолей молочной железы и яичников [9] и считается маркером неблагоприятного прогноза [10, 11]. В таких клетках ген белка P185^{HER2} амплифицирован [12]. Из-за выраженного участия в канцерогенезе P185^{HER2} может использоваться в качестве мишени для противоопухолевой терапии, а отсутствие специфического лиганда этого белка делает актуальным поиск антител, оказывающих терапевтический эффект.

В настоящее время доступен достаточно широкий спектр антител к внеклеточному домену P185^{HER2} [13–15]. Такие антитела могут не влиять на рост опухоли, могут стимулировать или угнетать ее рост [14]. Антитела, угнетающие рост опухолевых клеток, отбирают для разработки эффективных подходов к иммунотерапии опухолей. Противоопухолевый эффект антител может быть связан с инактивацией центра связывания рецептора с лигандами, со стимуляцией цитотоксического ответа натуральных киллеров, вызванной Fc-фрагментами антител [16], с подавлением протеинкиназной активности P185^{HER2} [17] или с удалением рецептора с поверхности клеток посредством индуцированного эндоцитоза [1, 18]. Последний механизм представляется многообещающим для разработки подходов к терапии опухолей. Противоопухолевый эффект еще более усиливается при соединении антител с токсинами [19, 20] или с белками, индуцирующими апоптоз [21], а также при использовании комбинации моноклональных антител к разным эпитопам P185^{HER2} [22].

Моноклональные антитела 4D5 к внеклеточному участку P185^{HER2}, расположенному вблизи трансмембранного домена, уже давно применяют-

ся при разработке терапевтических подходов и в качестве дополнительной терапии на ранних стадиях рака молочной железы (препараты трастузумаб или герцептин). Известно, что 4D5 ингибирует пролиферацию клеток, гиперэкспрессирующих P185^{HER2} [23]. В случае клеток с низким уровнем экспрессии P185^{HER2} цитотоксический эффект наблюдается при использовании 4D5, соединенного с радиоактивными хелатирующими агентами [24]. Показано, что 4D5 вызывают эндоцитоз P185^{HER2} и либо его деградацию в лизосомах [25], либо рециклинг [15].

В настоящей работе для изучения распределения P185^{HER2} предложено использовать гибридный белок, состоящий из одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) моноклонального антитела 4D5 против внеклеточного домена P185^{HER2} и двух молекул барназы — бактериальной РНКазы из *Bacillus amyloliquefaciens*, которая является одновременно и маркером, и токсином [26]. В качестве электронно-плотной метки для электронной микроскопии мы использовали ингибитор барназы — барстар, конъюгированный с коллоидным золотом. Для маркирования мы применяли предварительно сформированные комплексы между 4D5 scFv-дибарназой и барстаром-Au.

Барназа и барстар формируют строго стехиометрические комплексы с $K_D = 10^{-14}$ М. N- и C-концы обоих белков остаются доступными для взаимодействия с различными соединениями. Слияние 4D5 scFv с барназой не снижает активность и стабильность обеих частей химерной молекулы, они соединены гибким шарнирным участком, что повышает возможность взаимодействия с пространственно удаленными антигенами [26, 27]. Сконструированы плазмиды для экспрессии гибридных антител как в бактериальных [26], так и в эукариотических клетках [28]. Поскольку РНКаза оказывает токсическое действие на клетку [29, 30], гибридный белок может использоваться как своеобразный иммунотоксин, в котором барназа играет двойную роль — и маркерной молекулы, и цитотоксического агента [31].

Нами показана эффективность использования комплексов 4D5 scFv-дибарназа и барстар-Au для иммунной электронной микроскопии. С помощью 4D5 scFv-дибарназы и барстар-Au мы сравнили распределение P185^{HER2} в клетках опухолей человека — рака яичника (SKOV-3) и молочной железы (BT-474).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии и условия культивирования. Культивируемые клетки опухолей человека SKOV-3 (рак яичников) и BT-474 (рак молочной железы) растили в среде RPMI-1640 (“ПанЭко”, Россия) с 10%-ной эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота (“HyClone”, Бельгия) и глутамином в атмосфере 5% CO₂ при 37°C.

Синтез и очистка белков. 4D5 scFv-дибарназа и барстар получены и очищены согласно [29].

Получение коллоидного золота и его комплексов с барстаром и 4D5 scFv-дибарназой. Коллоидное золото (частицы размером 10 нм) готовили восстановлением HAuCl₄ цитратом натрия [32]. Получение и очистку комплексов барстара и 4D5 scFv-дибарназы с коллоидным золотом проводили в соответствии с методикой, описанной ранее [33].

Флуоресцентная микроскопия. Клетки инкубировали (1 ч при 4°C) в ФСБ, содержащем 1% БСА, с заранее приготовленным комплексом 4D5 scFv-дибарназа: барстар (20 : 40 нМ), потом с кроличьими антителами против барстара, любезно предоставленными R.W. Hurlley (NIH, Bethesda, США) (1 : 500, 1 ч), а затем с GAR-TR (1 : 1000, 1 ч, “Sigma”). После каждой инкубации клетки отмывали дважды холодным ФСБ. В контроле исключали стадии инкубации: с барстаром, с 4D5 scFv-дибарназой, с кроличьими антителами против барстара, с барстаром и кроличьими антителами против барстара. Клетки анализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 (“Carl Zeiss”). Микрофотографии получали с помощью CCD-камеры (AxioCam HRC, “Carl Zeiss”) и программы AxioVision (“Carl Zeiss”) и редактировали в программе Adobe Photoshop (“Adobe Systems”, США).

Конфокальная микроскопия. Клетки выращивали до плотности ~60% от монослоя в слайд-камере Lab-TekII (“Nalge Nunc International”), инкубировали с 20 нМ 4D5 scFv-дибарназы в течение ночи при 37°C, затем отмывали, фиксировали, пермеабилizировали согласно [34]. 4D5 scFv-дибарназу выявляли с помощью кроличьей антибарназной сыворотки, любезно предоставленной R.W. Hurlley (NIH, Bethesda, США) (1 : 500, 1 ч, 4°C) и GAR-FITC (1 : 400, 1 ч, 4°C, “Sigma”). После каждой стадии инкубации с антителами клетки дважды отмывали холодным ФСБ. В контроле опускали стадии инкубации с 4D5 scFv-дибарназой или кроличьей антибарназой сывороткой, или обе. Клетки анализировали в конфокальном микроскопе Nikon Eclipse TE2000.

Иммунная электронная микроскопия. Для образования комплекса 4D5 scFv-дибарназа:барстар-Au 4D5 scFv-дибарназу и барстар-Au смешивали в эквимолярном соотношении в растворе, содержащем ФСБ, pH 7.2 и 1%-ную сыворотку эмбрионов крупного рогатого скота. Конечная концен-

трация антител – 10 мкг/мл. Клетки снимали с подложки раствором ФСБ, pH 8, содержащим 5 mM EDTA и инкубировали с 4D5 scFv-дибарназой : барстар-Au или с 4D5 scFv-дибарназой-Au в течение 1 ч либо при 4°C, либо при 37°C. Часть клеток после инкубации при 4°C и отмывки в ФСБ выдерживали в течение 5 мин при 22°C. В контроле клетки SKOV-3 инкубировали с комплексом барстар-Au в течение 1 ч при 4°C и при 37°C. После инкубации клетки дважды отмывали ФСБ, собирали центрифугированием и готовили для электронно-микроскопического исследования. Клетки фиксировали 2%-ным глутаральдегидом (на 0.1 M ФБ, pH 7.2) в течение 2 ч, дополнительно фиксировали 1%-ным тетроксидом осмия в течение 1 ч. После дегидратации в этаноле и оксиде пропилене клетки заключали в смолу эпон-аралдит по стандартной методике. Ультратонкие срезы (50–70 нм) получали на ультрамикротоме LKB III, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Препараты изучали в электронном микроскопе JEM-100CX при 80 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Комплекс 4D5 scFv-дибарназа:барстар как система для иммунодетекции P185^{HER2}

Чтобы оценить возможность использования комплекса 4D5 scFv-дибарназа:барстар для изучения локализации P185^{HER2} на клетках злокачественных опухолей, мы исследовали с помощью иммунофлуоресцентного анализа связывание этого комплекса с клетками рака яичника человека SKOV-3, гиперэкспрессирующими P185^{HER2} (рис. 1а–е). Эти клетки имеют многочисленные выросты, которые образуют сложную систему межклеточных контактов в популяции. Вследствие этого клетки SKOV-3, растущие в культуре, с довольно высокой эффективностью формируют колонии (рис. 1а, в). В клетках SKOV-3, последовательно инкубированных при 4°C с комплексом 4D5 scFv-дибарназа:барстар, кроличьими антителами против барстара и GAR-TR, наблюдалась мембранная флуоресценция (рис. 1а, б). В контроле опускали следующие стадии инкубации: с барстаром (рис. 1в, г), с 4D5 scFv-дибарназой (не показано), с кроличьими антибарстарными антителами (не показано), с барстаром и кроличьими антибарстарными антителами (не показано). Во всех контрольных вариантах флуоресценция не детектировалась. Таким образом, с помощью флуоресцентной микроскопии показано, что комплекс 4D5 scFv-дибарназа:барстар может использоваться для выявления P185^{HER2} на поверхности опухолевых клеток.

Интернализация P185^{HER2} после связывания с 4D5 scFv-дибарназой

Взаимодействие 4D5 scFv-дибарназы с клетками SKOV-3 изучали с помощью конфокальной микроскопии (рис. 1*д, е*). Клетки SKOV-3 инкубировали с 4D5 scFv-дибарназой в течение ночи при 37°C, фиксировали, пермеабилizировали, а затем окрашивали кроличьей антибарназой сывороткой и GAR-FITC. Яркую флуоресценцию наблюдали и на поверхности, и внутри клеток (рис. 1*д*), что указывает на связывание 4D5 scFv-дибарназы с P185^{HER2} и проникновение иммуноконъюгата в клетку. В контроле, когда отсутствовали стадии инкубации с 4D5 scFv-дибарназой (рис. 1*е*) или с кроличьей антибарназой сывороткой, или обе стадии (данные не показаны), флуоресценция в клетках SKOV-3 не детектировалась. Таким образом, с помощью конфокальной микроскопии показано, что взаимодействие с 4D5 scFv-дибарназой приводит к интернализации P185^{HER2}.

Иммуноэлектронно-микроскопическое выявление P185^{HER2} в клетках SKOV-3 и BT-474 с помощью комплексов 4D5 scFv-дибарназа:барстар-Au

Мы изучили распределение P185^{HER2} в клетках SKOV-3 на электронно-микроскопическом уровне. Для мечения P185^{HER2} использовали предварительно полученные комплексы 4D5 scFv-дибарназа:барстар-Au. Клетки SKOV-3 инкубировали с комплексом 4D5 scFv-дибарназа:барстар-Au (10 нм) в течение 1 ч при 4°C. На рис. 2*а, б* видно, что мембрана клетки образует многочисленные длинные выросты, причем участки с выростами чередуются с гладкими участками. Метка располагалась исключительно на поверхности клетки (рис. 2*а–в*) — на длинных или почковидных выростах (рис. 2*а*), формировала кластеры у их основания (рис. 2*б*, отмечены звездочками), или локализовалась в местах примыкания выростов к телу клетки (рис. 2*б, в*). Гладкие участки мембраны практически не метились (рис. 2*б, в*). Окаймленные ямки также не метились (рис. 2*б*). После отмывки антител и инкубации в течение 5 мин при 22°C в некоторых клетках появились меченые окаймленные везикулы (рис. 2*г*). Кроме того, была найдена единичная эндосома, содержащая метку (рис. 2*д*). Таким образом, показано, что инкубация SKOV-3 с 4D5 scFv-дибарназой стимулирует эндоцитоз P185^{HER2}.

Для изучения эндоцитоза P185^{HER2} мы инкубировали клетки SKOV-3 с комплексом 4D5 scFv-дибарназа:барстар-Au при 37°C в течение 1 ч. На рис. 3*а, б* видно, что значительное количество P185^{HER2} осталось на поверхности клеток — на выростах, у их основания и в областях контакта выростов с телом клетки. Высокая плотность метки

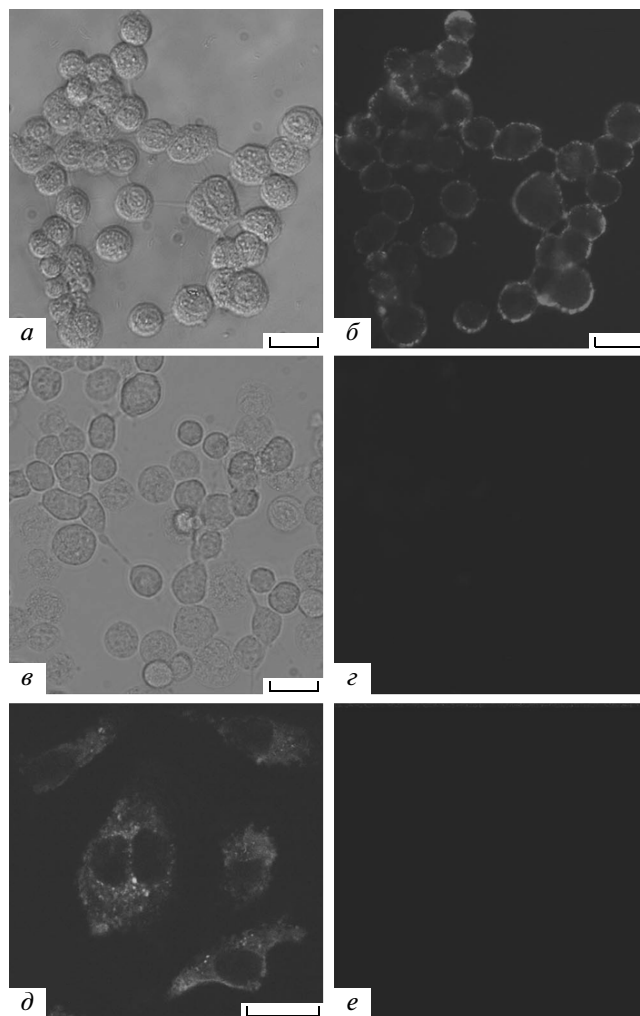


Рис. 1. Взаимодействие клеток SKOV-3 с комплексом 4D5 scFv-дибарназа:барстар (*а–г*) и с 4D5 scFv-дибарназой (*д, е*). Флуоресцентная микроскопия. После инкубации SKOV-3 с комплексом 4D5 scFv-дибарназа:барстар, кроличьими антителами к барстару и GAR-TR при 4°C (*а, б*) флуоресценция выявляется на поверхности клеток (*б*). При исключении из инкубационной смеси барстара (*в, г*) флуоресценция не детектируется (*г*) (*а, в* — фазовый контраст). Конфокальная микроскопия. После инкубации SKOV-3 с 4D5 scFv-дибарназой при 37°C, пермеабилizации и последовательной инкубации с кроличьей антибарназой сывороткой и GAR-FITC при 4°C флуоресценция наблюдается на поверхности и внутри клеток (*д*). В контроле, где стадия инкубации с 4D5 scFv-дибарназой пропущена, флуоресценция отсутствует (*е*). Масштабный отрезок: *а–г* — 10 мкм, *д* — 5 мкм.

наблюдалась в окаймленных ямках (рис. 3*в*) и везикулах вблизи поверхности клетки (рис. 3*г*). Метка выявлена в эндосомах, которые формируют скопления в цитоплазме (рис. 3*д, е*). Подобные агрегаты эндосом, аккумулирующих интернализированный P185^{HER2}, были описаны ранее [13, 35]. Рядом с мечеными эндосомами находились группы мультивезикулярных телец, содержащих

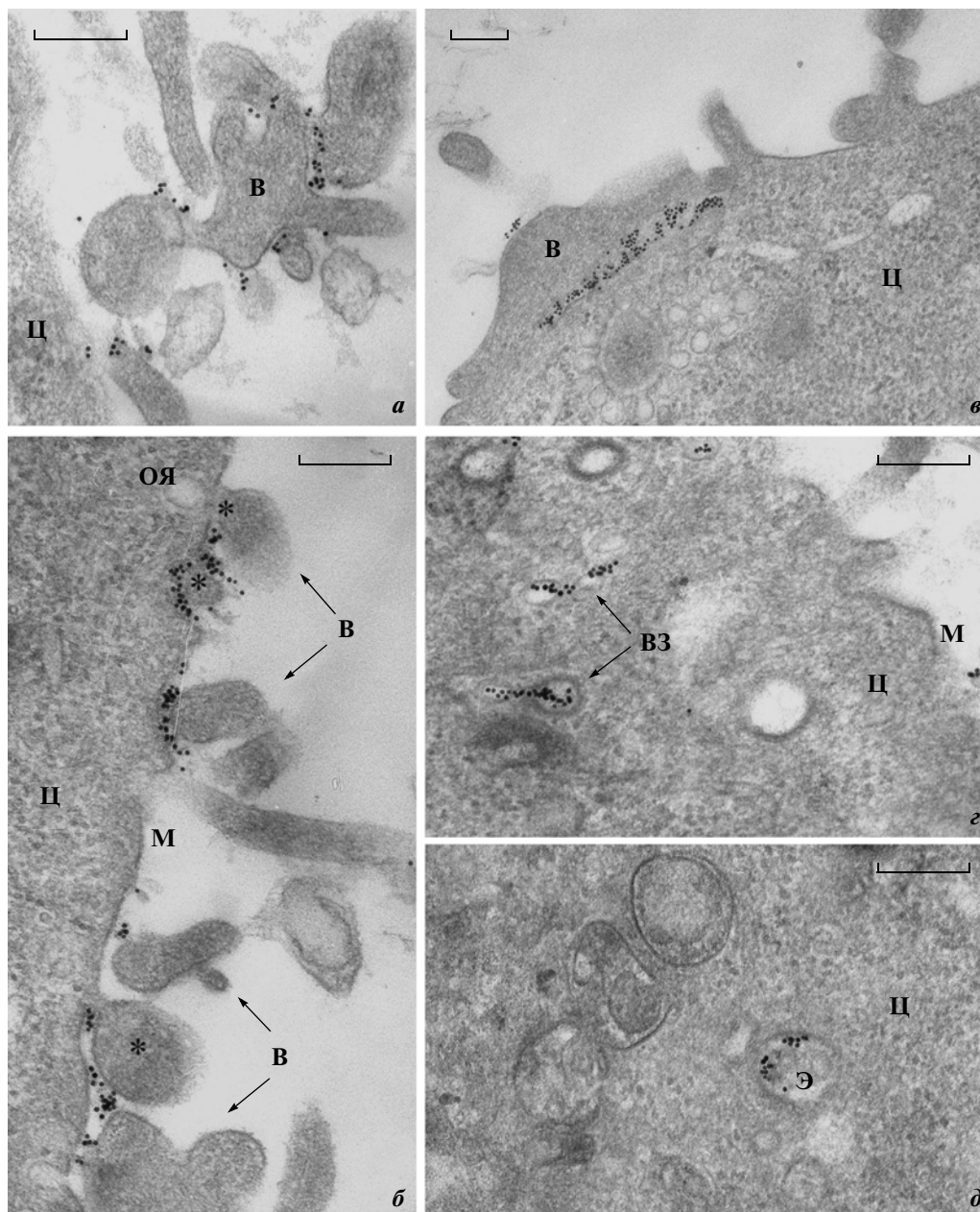


Рис. 2. Электронная микроскопия клеток SKOV3, инкубированных с комплексом 4D5 scFv-дибарназа:барстар-Au при 4°C. P185^{HER2} выявляется на выростах (а), у их основания (б, отмечены звездочками) и в зонах примыкания выростов к телу клетки (б, в). После отмывки антител и инкубации в течение 5 мин при 22°C (с, д) метка появляется в группах окаймленных везикул (с) и в эндосоме (д). Здесь и на рис. 3–6: масштабный отрезок – 200 нм, Ц – цитоплазма, Я – ядро, В – выросты, ОЯ – окаймленные ямки, ВЗ – везикулы, Э – эндосомы, МВТ – мультивезикулярные тельца, Л – лизосомы, М – мембрана.

метку (рис. 3е). Единичная метка выявлялась в везикулярных трубчатых мембранных структурах, расположенных рядом с эндосомами (рис. 3е, стрелка). Кроме того, некоторое количество частиц золота обнаружено непосредственно в цитоплазме (рис. 3д, е, маленькие стрелки). В контроле клетки SKOV-3 инкубировали с комплексом барстар-Au в течение 1 ч при 4°C (не показано) и

37°C (рис. 3ж). Частицы золота на клетках практически отсутствовали (рис. 3ж).

Поверхность клеток SKOV-3 покрыта многочисленными длинными и почковидными выростами, которые ветвятся и контактируют с телом клетки и другими выростами. Поэтому для более точной интерпретации результатов иммуномечення мы сделали серийные срезы клеток SKOV-3,

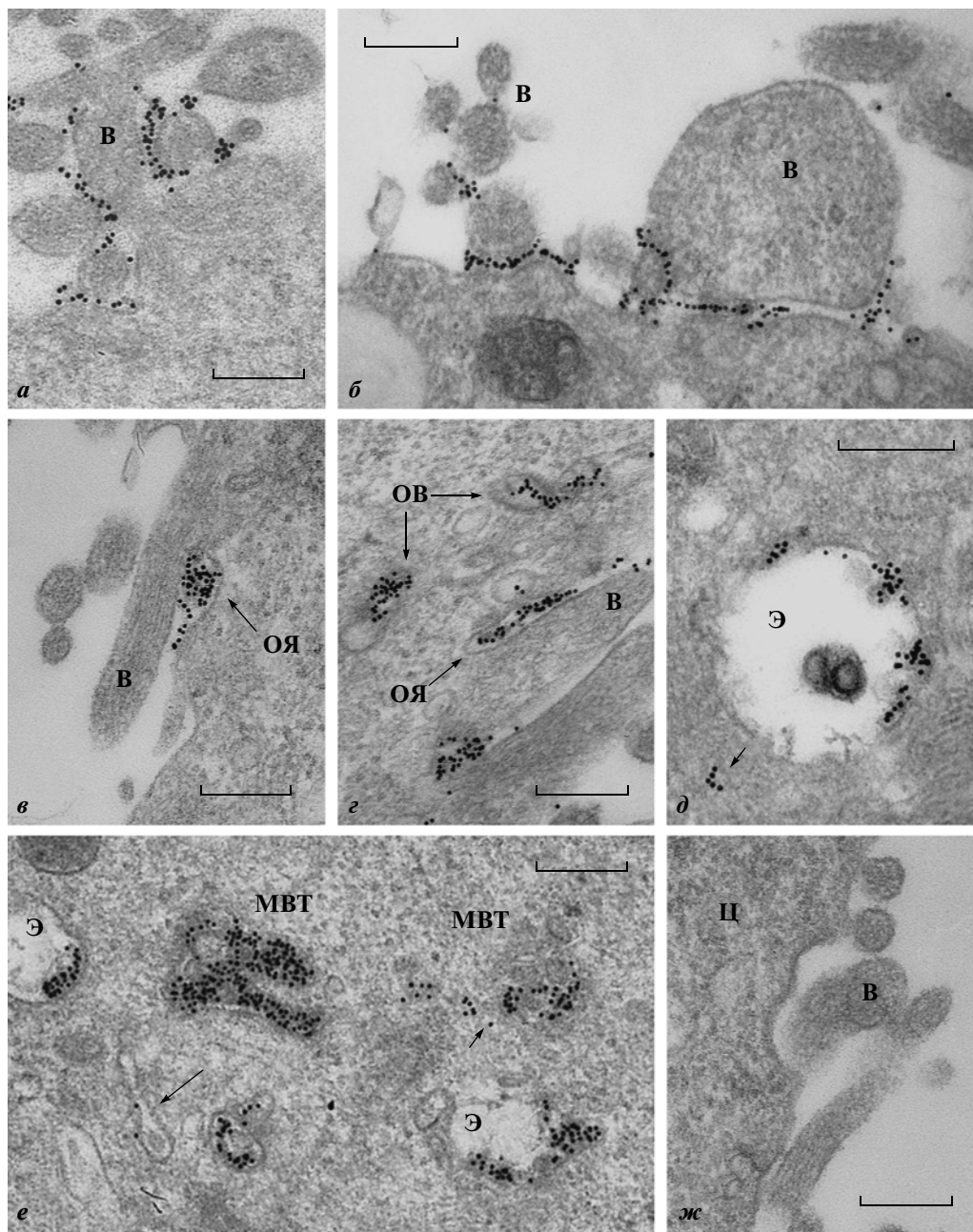


Рис. 3. Электронная микроскопия клеток SKOV-3, инкубированных с комплексом 4D5 scFv-дибарназа:барстар-Аu при 37°C. Метка выявляется как на поверхности — на выростах и у их основания (а, б), и в окаймленных ямках (в, з), так и внутри клеток — в окаймленных везикулах (з), эндосомах (д, е) и мультивезикулярных тельцах (е). Единичные частицы золота найдены в цитоплазме (д, е, маленькие стрелки), а также в трубчатых везикулярных мембранных структурах (е, стрелка) вблизи эндосом и мультивезикулярных телец. При инкубации клеток SKOV-3 только с барстар-Аu метка практически отсутствует (ж).

инкубированных с комплексом 4D5 scFv-дибарназа:барстар-Аu при 4°C (рис. 4а–з). Видно, что выросты II и III отходят непосредственно от клетки, и метка локализуется как на выростах II и III, так и у их основания. При этом вырост III разветвляется на группу более мелких выростов как контактирующих друг с другом, так и примыкающих к клеточной мембране (рис. 4а, з). В этом слу-

чае метка локализуется на выростах и в участках контакта между выростами и мембраной клетки (рис. 4а, з). Выросты I и II имеют общее основание, при этом вырост I прилегает к телу клетки, и метка расположена как на выросте I, так и в участке его контакта с мембраной клетки (рис. 4а, з).

Для того чтобы проверить, не влияет ли взаимодействие миниантител 4D5 scFv-дибарназа с

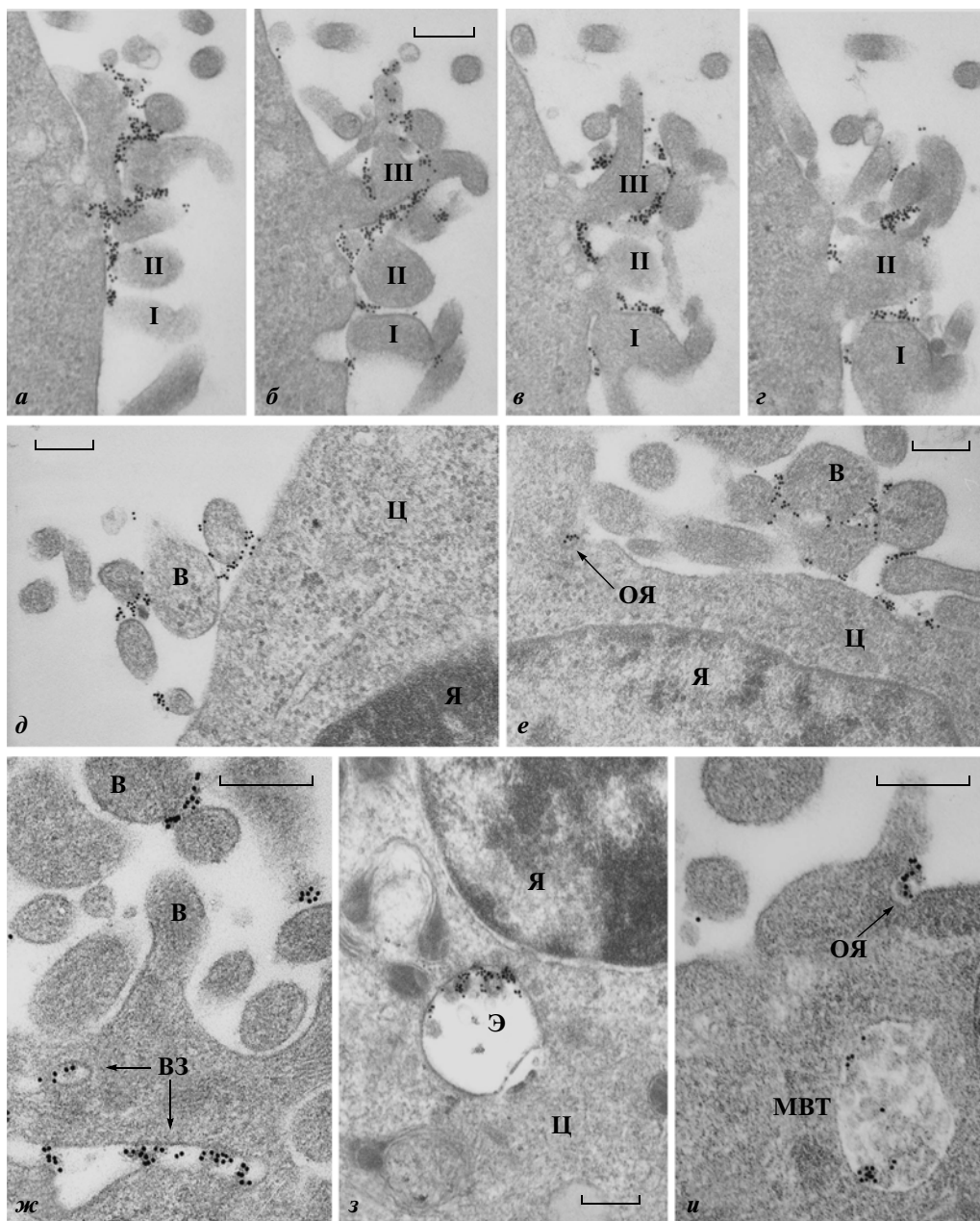


Рис. 4. Электронная микроскопия клеток SKOV-3, инкубированных с комплексом 4D5 scFv-дибарназа:барстар-Au (*a–e*) и с 4D5 scFv-дибарназой-Au (*d–u*). Серийные срезы клеток SKOV-3, инкубированных с комплексом 4D5 scFv-дибарназа:барстар-Au при 4°C (*a–e*). Вырост I: метка локализуется на выросте (*e, z*) и в области его контакта с мембраной клетки (*a–z*). Вырост II: частицы золота располагаются на выросте (*a, б, z*) и у его основания (*a–z*). Вырост III: метка выявляется на выросте (*б, в*) и у его основания (*в*). После инкубации клеток SKOV-3 с 4D5 scFv-дибарназой-Au при 4°C метка локализуется исключительно на поверхности клетки – на выростах или у их основания (*д*). При 37°C метка выявляется как на выростах и у их основания (*e, ж*), так и в окаймленных ямках (*e, u*), везикулах (*ж*) и мультивезикулярных тельцах (*u*).

барстар-Au на распределение P185^{HER2}, мы поместили клетки SKOV-3 комплексами антител 4D5 scFv-дибарназа с коллоидным золотом. Характер распределения частиц Au не изменился: при 4°C метка локализовалась исключительно на поверхности клетки – на выростах, у их основания и в

местах примыкания к телу клетки (рис. 4д). При 37°C P185^{HER2} выявлялся как на поверхности клетки (рис. 4е, ж), так и интернализировался через окаймленные ямки (рис. 4е, u) и везикулы (рис. 4ж) и концентрировался в эндосомах (рис. 4з) и мультивезикулярных тельцах (рис. 4u). Таким об-

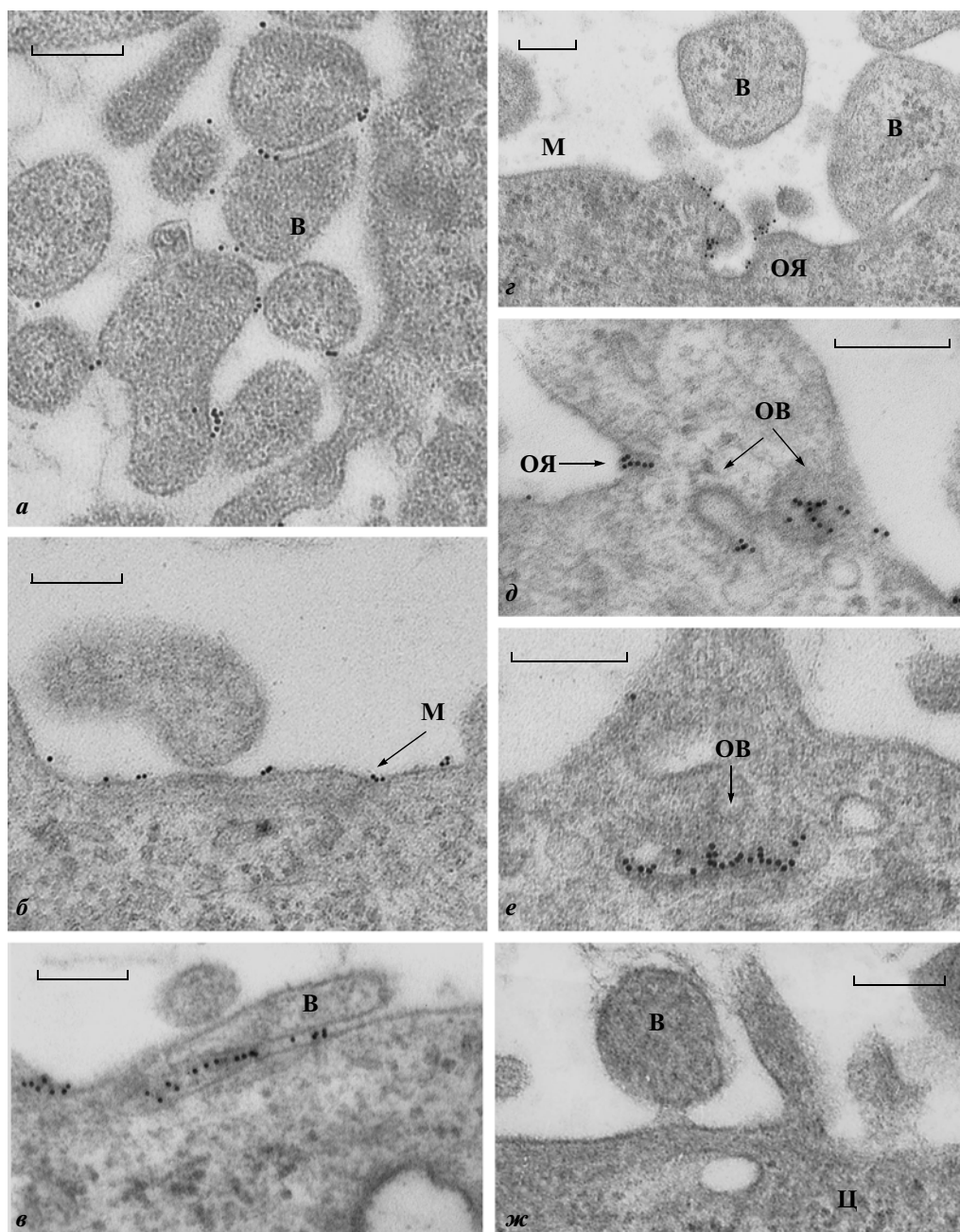


Рис. 5. Электронная микроскопия клеток BT-474, инкубированных с комплексом 4D5 scFv-дибарназа:барстар-Au при 4°C. P185^{HER2} выявляется на выростах и у их основания (а, в), а также на гладких участках мембраны (б). После отмывки антител и инкубации в течение 5 мин при 22°C метятся окаймленные ямки (г, д) и везикулы (д, е). При инкубации клеток BT-474 только с барстар-Au метки не обнаружено (ж).

разом, наблюдаемое распределение не зависит от используемого комплекса — 4D5 scFv-дибарназа:барстар-Au или 4D5 scFv-дибарназа-Au.

Иммуномечение клеток BT-474 комплексом 4D5 scFv-дибарназа:барстар-Au дало следующие результаты. После инкубации в течение 1 ч при 4°C P185^{HER2} находился на поверхности клетки в основном на выростах, у их основания и в зонах контакта с мембраной клетки (рис. 5а, в), но мет-

ка выявлена также и на гладких участках мембраны (рис. 5б). После отмывки антител и инкубации в течение 5 мин при 22°C можно было видеть меченые окаймленные ямки (рис. 5г, д), а также круглые и длинные окаймленные везикулы, расположенные вблизи мембраны клетки (рис. 5д, е).

Для контроля специфичности мечения клетки BT-474 инкубировали с комплексом барстар-Au в

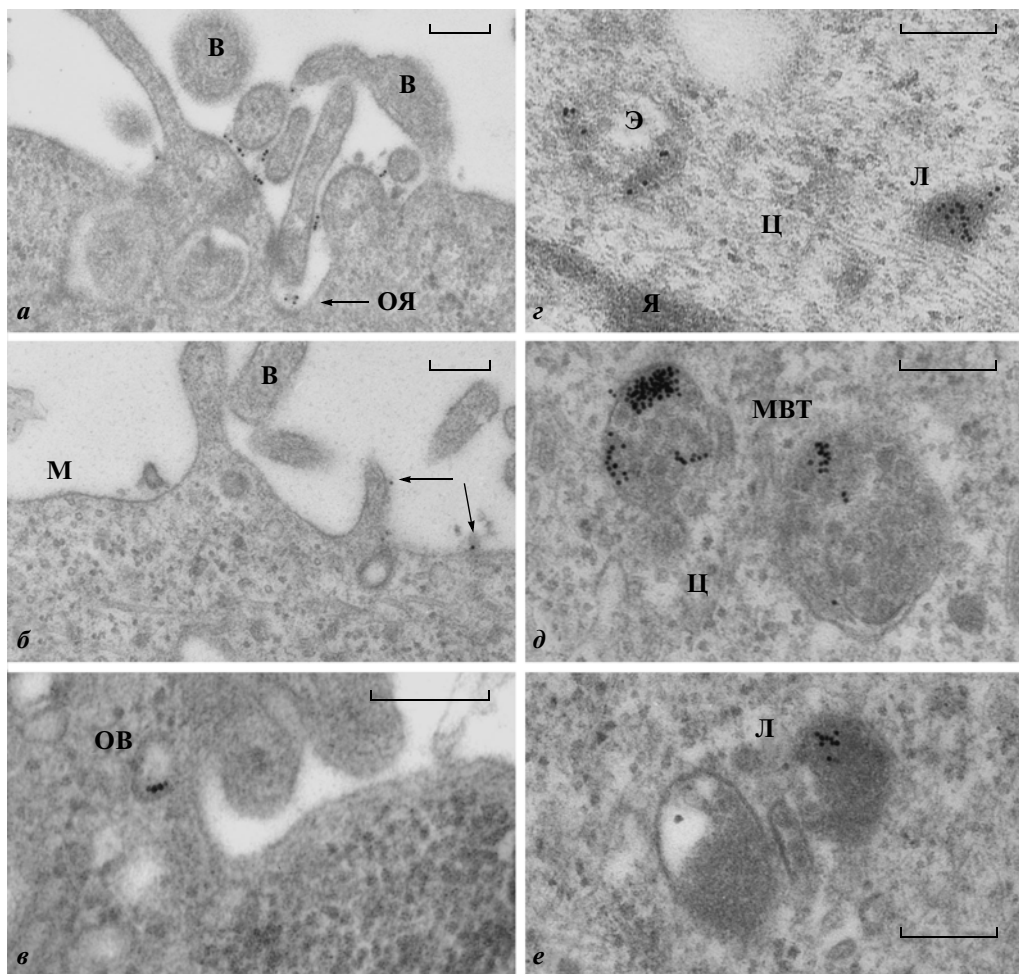


Рис. 6. Электронная микроскопия клеток BT-474, инкубированных с комплексом 4D5 scFv-дигарназа:барстар-Au при 37°C. Небольшое количество метки выявляется на поверхности клетки на выростах (*а, б*, стрелки), в окаймленных ямках (*а*) и везикулах (*б*). В основном метятся эндосомы (*г*), мультивезикулярные тельца (*д*) и лизосомы (*г, е*).

отсутствие миниантител. Метки обнаружено не было (рис. 5ж).

Инкубация клеток BT-474 с комплексом 4D5 scFv-дигарназа:барстар-Au при 37°C в течение 1 ч приводит к эндоцитозу P185^{HER2}. В отличие от клеток SKOV-3 на поверхности клеток BT-474 метка была единичной, несмотря на инкубацию в присутствии избытка комплекса 4D5 scFv-дигарназа:барстар-Au. Редкие частицы золота можно было видеть на выростах и гладких участках мембраны (рис. 6а, б, стрелки) и в окаймленных ямках (рис. 6а). Практически вся метка находилась внутри клетки. Единичная метка наблюдалась в окаймленных везикулах (рис. 6б) и непосредственно в цитоплазме (не показано). В основном метились эндосомы (рис. 6г), рассеянные по всему объему клетки, — от примембранных до околоядерных областей, мультивезикулярные тельца (рис. 6д) и лизосомы (рис. 6г, е).

Таким образом, эндоцитоз P185^{HER2}, стимулированный взаимодействием с 4D5 scFv-дигарназой, приводит к почти полному удалению рецептора с поверхности клеток BT-474.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы изучали поверхностное (при 4°C) и внутриклеточное (при 37°C) распределение белка P185^{HER2} после его взаимодействия с комплексом 4D5 scFv-дигарназа:барстар-Au.

При 4°C P185^{HER2} локализуется преимущественно на выростах, у их основания и в местах сближения выростов с телом клетки. Концентрация метки на выростах в клетках SKOV-3, более полная, чем в клетках BT-474, коррелирует с меньшей степенью интернализации рецептора в клетках SKOV-3. При росте в культуре клетки SKOV-3 формируют систему разветвленных межклеточных контактов с помощью длинных выростов, поэтому нельзя исключить, что в некоторых слу-

чаях метка находится в зонах контакта между мембранами и концевыми отделами выростов соседних клеток. Наличие многочисленных длинных выростов указывает на агрессивность опухоли [36], а концентрация P185^{HER2} на выростах и в зонах межклеточных контактов может быть признаком повышенной инвазивности опухоли и неблагоприятного прогноза.

Мы проследили внутриклеточный транспорт комплексов P185^{HER2} с 4D5 scFv-дибарназой:барстар-Au после его интернализации в клетках SKOV-3 и BT-474. Метку обнаружили в большинстве компартментов, ассоциированных с различными стадиями рецептор-опосредованного эндоцитоза: на мембране, в окаймленных ямках, транспортных везикулах, эндосомах, в цитоплазме, мультивезикулярных тельцах и лизосомах (рис. 2–6). В клетках BT-474 P185^{HER2} интернализировался с большей скоростью, чем в клетках SKOV-3. На это указывает почти полное отсутствие метки на поверхности клетки спустя 1 ч после начала эндоцитоза, большое количество меченых эндосом во внутренних частях клетки вблизи ядра, и лизосомы, содержащие метку.

В соответствии со схемой внутриклеточного транспорта [37] после эндоцитоза рецептор подвергается либо рециклингу, либо деградации. Судьба рецептора определяется чувствительностью комплекса рецептор-антитело к кислотной деградации на пути от эндосом к лизосомам. Менее стойкие комплексы диссоциируют раньше, и рецептор подвергается рециклингу. Более устойчивые комплексы диссоциируют позже, и рецепторы в комплексе с антителом деградируют в лизосомах [37]. Диссоциация рецептора и антитела происходит в везикулярных трубчатых мембранных структурах, расположенных рядом с эндосомами [38]. Однако существует возможность рециклинга рецептора P185^{HER2} в комплексе с антителами [4, 15, 39]. В этом случае комплекс рецептора с антителами также регистрируется в везикулярных трубчатых структурах [15]. В нашей работе мы обнаружили лишь единичную метку в таких структурах только в клетках SKOV-3 (рис. 4e, стрелка). Это может указывать на рециклинг P185^{HER2} после интернализации в клетках SKOV-3 и его отсутствие в клетках BT-474. Кроме того, на отсутствие рециклинга в клетках BT-474 указывает то, что спустя 1 ч после интернализации даже при избытке 4D5 scFv-дибарназы:барстар-Au в инкубационной смеси практически отсутствует метка на мембране (рис. 6б). Поскольку необратимое удаление P185^{HER2} с поверхности клетки одна из целей противоопухолевой терапии, исчезновение P185^{HER2} с мембраны клеток BT-474, стимулированное комплексом 4D5 scFv-дибарназа:барстар-Au, может оказаться важным при разработке терапевтических схем.

Необратимость удаления P185^{HER2} с поверхности клеток обеспечивается деградацией рецептора. Показателем деградации интернализованного P185^{HER2} или его комплекса с антителами служит метка в лизосомах. Спустя 1 ч после инкубации с комплексом 4D5 scFv-дибарназа:барстар-Au в клетках SKOV-3 найдены многочисленные меченые поздние эндосомы и мультивезикулярные тельца (рис. 3д, e), но не лизосомы, тогда как в клетках BT-474 выявлены довольно интенсивно меченые лизосомы (рис. 6г, e). Подобные различия в распределении метки могут быть следствием относительно более быстрой и полной интернализации и отсутствия рециклинга P185^{HER} в клетках BT-474.

Ранее было показано, что клетки BT-474 обладают высокой чувствительностью к обработке барназой ($IC_{50} = 0.21$ мкМ, МТТ-анализ), а SKOV-3 – средней ($IC_{50} = 5$ мкМ), хотя обе линии клеток одинаково чувствительны к 4D5 scFv-дибарназе ($IC_{50} = 1.8$ нМ) [29, 39]. Возможно, различия в распределении комплексов P185^{HER2} с 4D5 scFv-дибарназой:барстар-Au в клетках SKOV-3 и BT-474 могут быть связаны с различной чувствительностью этих клеточных линий к барназе.

Мы обнаружили метку также в цитоплазме, вне каких-либо мембранных структур (рис. 3д, e, маленькие стрелки). О появлении метки в цитоплазме в результате эндоцитоза P185^{HER2} упоминали и ранее [18], однако механизм высвобождения в цитоплазму P185^{HER2} или его комплекса с антителами остается неизвестным. Описано несколько альтернативных путей эндоцитоза не через окаймленные ямки [41], в частности, через кавеолы – пузырьки размером 50–80 нм, морфологически отличные от окаймленных везикул [4]. Предполагается, что молекулы, интернализирующиеся через кавеолы, могут высвобождаться непосредственно в цитоплазму [1]. Однако мы не обнаружили эндоцитоза P185^{HER2} через кавеолы. Вероятно, высвобождение метки в цитоплазму происходит из эндосом, во всяком случае, цитоплазматическую метку выявили в непосредственной близости к эндосомам (рис. 4e). Можно предположить, что мембраны эндосом и внутриэндосомных меченых пузырьков сливаются, и их содержимое выходит в цитоплазму. Обнаружение метки в цитоплазме указывает на то, что барназа может осуществлять деградацию цитоплазматической РНК, что приводит к гибели опухолевых клеток [29]. Возможно, выход комплекса из эндосом в цитоплазму обусловлен какими-то свойствами барназы, специфичными для РНКаз. По крайней мере, выход так называемых противоопухолевых РНКаз (онконаз) в цитоплазму наблюдали при изучении их эндоцитоза [42].

В последние годы появились многочисленные свидетельства о транспорте P185^{HER2} и гомоло-

гичных рецепторов с поверхности клетки в ядро [43–45]. Однако мы не обнаружили метки в ядре после интернализации P185^{HER2} ни в клетках SKOV-3, ни в клетках BT-474.

Таким образом, можно утверждать, что 4D5 scFv-дибарназа и барстар-Au могут использоваться в качестве новой системы иммунодетекции для изучения поверхностного и внутриклеточного распределения P185^{HER2} в разных типах клеток с целью определения агрессивности опухоли и последующего клинического прогноза. Если принять во внимание цитотоксичность барназы, то выявленная в настоящей работе интернализация 4D5 scFv-дибарназы и комплекса 4D5 scFv-дибарназа:барстар-Au может быть важна для разработки новых методов терапии опухолей [31].

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (11-04-12091-офим-2011, 11-04-01967 и 12-04-00757-а), программой Президиума РАН “Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов” и “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Waterman H., Yarden Y. 2001. Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of Erb receptor tyrosine kinases. *FEBS Lett.* **490**, 142–152.
- Roepstorff K., Grovdal L., Grandal M., Lerdrup M., van Derus B. 2008. Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 563–578.
- Graus-Porta D., Beerli R.R., Hynes N.E. 1995. Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1182–1191.
- Sorkin A., Goh L.K. 2009. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp. Cell Res.* **315**, 683–696.
- Worthylake R., Wiley H.S. 1997. Structural aspects of the epidermal growth factor receptor required for transmodulation of erbB-2/neu. *J. Biol. Chem.* **272**, 8594–8601.
- Wilson S.J., Amsler K., Hyink D.P., Li X., Lu W., Zhou J., Burrow C.R., Wilson P.D. 2006. Inhibition of HER-2(neu/ErbB2) restores normal function and structure to polycystic kidney disease (PKD) epithelia. *Biochim. Biophys. Acta.* **1762**, 647–655.
- Yang Z., Barnes C.J., Kumar R. 2004. Human epidermal growth factor receptor 2 status modulates subcellular localization of and interaction with estrogen receptor α in breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **10**, 3621–3628.
- Hendriks B.S., Opresko L.K., Wiley H.S., Lauffenburger D. 2003. Coregulation of epidermal growth factor receptor/human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) levels and locations: quantitative analysis of HER2 overexpression effects. *Cancer Res.* **63**, 1130–1137.
- Menard S., Pupa S.M., Campiglio M., Tagliabue E. 2003. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene.* **22**, 6570–6578.
- Zschiesche W., Schonborn I., Minguillon C., Spitzer E. 1994. Significance of immunohistochemical c-erbB-2 product localization pattern for prognosis of primary human breast cancer. *Cancer Lett.* **81**, 89–94.
- Cohen B.D., Siegall C.B., Bacus S., Foy L., Green J.M., Hellstrom I., Hellstrom K.E., Fell H.P. 1998. Role of epidermal growth factor receptor family members in growth and differentiation of breast carcinoma. *Biochem. Soc. Symp.* **63**, 199–210.
- Kallioniemi O.P., Kallioniemi A., Kurisu W., Thor A., Chen L.C., Smith H.S., Waldman F.M., Pinkel D., Gray J.W. 1992. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence *in situ* hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 5321–5325.
- Maier L.A., Xu F.J., Hester S., Boyer C.M., McKenzie S., Bruskin A.M., Argon Y., Bast R.C., Jr. 1991. Requirements for the internalization of a murine monoclonal antibody directed against the HER-2/neu gene product c-erbB-2. *Cancer Res.* **51**, 5361–5369.
- Hurwitz E., Stancovski I., Sela M., Yarden Y. 1995. Suppression and promotion of tumor growth by monoclonal antibodies to ErbB-2 differentially correlate with cellular uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 3353–3357.
- Austin C.D., De Maziere A.M., Pisacane P.I., Van Dijk S.M., Eigenbrot C., Sliwkowski M., Klumperman J., Scheller R.H. 2004. Endocytosis and sorting of Erb2 and site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 5268–5282.
- Karagiannis P., Singer J., Hunt J., Gan S.K.E., Rudman S.M., Mechtcheriakova D., Knittelfelder R., Daniels T.R., Hobson P.S., Beavil A.J., Spicer J., Nestle F.O., Penichet M.L., Gould H.J., Jensen-Jarolim E., Karagiannis S. 2009. Characterisation of an engineered trastuzumab IgE antibody and effect on cell mechanisms targeting HER2/neu-positive tumor cells. *Mol. Cancer Res.* **58**, 915–926.
- Lerdrup M., Bruun S., Grandal M., Roepstorff K., Kristensen M., Hommelgaard A., van Deurs B. 2007. Endocytic down-regulation of ErbB2 is stimulated by cleavage of its C-terminus. *Mol. Biol. Cell.* **18**, 3656–3666.
- Park J.W., Hong K., Kirpotin D.B., Meyer O., Papahadjopoulos D., Benz C.C. 1997. Anti-HER2 immunoliposomes for targeted therapy of human tumors. *Cancer Lett.* **118**, 153–160.
- Wels W., Beerli R., Hellmann P., Schmidt M., Martel B.M., Kornilova E.S., Hekele A., Mendelsohn J., Groner B., Hynes N.E. 1995. EGF receptor and p185erbB-2-specific single-chain antibody toxins differ in their cell-killing activity on tumor cells expressing both receptor proteins. *Int. J. Cancer.* **60**, 137–144.
- Di Lazzaro C., Digiesi G., Tecce R., Lotti L.V., Torrisi M.R., Natali P.G. 1994. Immunotoxin to the HER-2 oncogene product: functional and ultrastructural analysis of their activity. *Cancer Immunol. Immunother.* **39**, 318–324.
- Yu C.J., Jia L.T., Meng Y.L., Zhao J., Zhang Y., Qiu X.C., Xu Y.M., Wen W.H., Yao L.B., Fan D.M.,

- Jin B.Q., Chen S.Y., Yang A.G. 2006. Selective proapoptotic activity of a secreted recombinant antibody/AIF fusion protein in carcinomas overexpressing HER2. *Gene Ther.* **13**, 313–320.
22. Ben-Kasus T., Schechter B., Lavi S., Yarden Y., Sela M. 2009. Persistent elimination of ErbB-2/HER2-overexpressing tumors using combinations of monoclonal antibodies: Relevance of receptor endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 3294–3299.
23. Sarup J.C., Johnson R.M., King K.L., Fendly B.M., Lipari M.T., Napier M.A., Ullrich A., Shepard H.M. 1991. Characterization of an anti-P185^{HER2} monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth. *Growth Regul.* **1**, 72–82.
24. Tsai S.W., Sun Y., Williams L.E., Raubitschek A.A., Wu A.M., Shively J.E. 2000. Biodistribution and radioimmunotherapy of human breast cancer xenografts with radiometal-labeled DOTA conjugated anti-HER2/neu antibody 4D5. *Bioconjug. Chem.* **11**, 327–334.
25. De Santes K., Slamon D., Anderson S.K., Shepard M., Fendly B., Maneval D., Press O. 1992. Radiolabeled antibody targeting of the HER-2/neu oncoprotein. *Cancer Res.* **52**, 1916–1923.
26. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Pluckthun A. 2003. Design of multivalent complexes using the barnase-barstar module. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1486–1492.
27. Nikitin M.P., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. 2010. Protein-assisted self-assembly of multifunctional nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 5827–5832.
28. Glinka E.M., Edelweiss E.F., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. 2006. A new vector for controllable expression of anti-HER2/neu mini-antibody-barnase fusion protein in HEK 293T cells. *Gene.* **366**, 97–103.
29. Edelweiss E.F., Balandin T.G., Ivanova J.L., Lutsenko G.V., Leonova O.G., Popenko V.I., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. 2008. Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells. *PLoS ONE.* **3**, 24–34.
30. Yazynin S., Lange H., Mokros T., Deyev S., Lemke H. 1999. A new phagemid vector for positive selection of recombinants based on a conditionally lethal barnase gene. *FEBS Lett.* **452**, 351–354.
31. Polanowski O.L., Lebedenko E.N., Deyev S.M. 2012. ERBB oncogene proteins as targets for monoclonal antibodies. *Biochemistry.* **77**, 227–245.
32. Slot J.W., Geuze H.J. 1985. A new method of preparing gold probes for multiple-labelling cytochemistry. *Eur. J. Cell Biol.* **38**, 87–93.
33. Slot J.W., Geuze H.J. 1981. Sizing of protein A-colloidal gold probes for immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* **90**, 533536.
34. Becerril B., Poul M.A., Marks J.D. 1999. Toward selection of internalizing antibodies from phage libraries. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 386–393.
35. Hommelgaard A.M., Lerdrup M., van Deurs B. 2004. Association with membrane protrusions makes ErbB2 an internalization-resistant receptor. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 1557–1567.
36. Yarden Y. 2001. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology.* **61**, 1–13.
37. Waterman H., Sabanai I., Geiger B., Yarden Y. 1998. Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J. Biol. Chem.* **273**, 13819–13827.
38. Geuze H.J., Slot J.W., Strous G.J., Lodish H.F., Schwartz A.L. 1983. Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis. *Cell.* **32**, 277–287.
39. Burke P., Schooler K., Wiley H.S. 2000. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 1897–1910.
40. Balandin T.G., Evelina Edelweiss E., Andronova N.V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. 2011. Antitumor activity and toxicity of anti-HER2immunoRNase scFv 4D5-dibarnase in mice bearing human breast cancer xenografts. *Invest. New Drugs.* **29**, 2232.
41. Barr D.J., Ostermeyer-Fay A.G., Matundan R.A., Brown D. 2008. Clatrin-independent endocytosis of ErbB2 in geldanamycin-treated human breast cancer cells. *J. Cell Sci.* **121**, 3155–3166.
42. Haigis M.C., Raines R.T. 2003. Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway. *J. Cell Sci.* **116**, 313–324.
43. Giri D.K., Ali-Sayed M., Li L.Y., Lee D.F., Ling P., Bartholomeusz G., Wang S.C., Hung M.C. 2005. Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 11005–11018.
44. Chen Q.Q., Chen X.Y., Jiang Y.Y., Liu J. 2005. Identification of novel nuclear localization signal within the ErbB-2 protein. *Cell Res.* **15**, 504–510.
45. Lo H.W., Ali-Sayed M., Wu Y., Bartholomeusz G., Hsu S.C., Hung M.C. 2006. Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1. *J. Cell Biochem.* **98**, 1570–1583.