

## THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN GEN ĐỘC TỐ MIỄN DỊCH ANTI-HER2-MELITTIN (HERMEL) TRONG *E. COLI*

Nguyễn Thị Thanh Dịu, Lã Thị Huyền, Phan Minh Tuấn, Lê Quang Huấn

Viện Công nghệ sinh học

### TÓM TẮT

Thụ thể HER2 có sự biểu hiện mạnh trong 20 - 30% bệnh nhân ung thư vú và thường liên quan tới việc tiên lượng xấu, do vậy có nhiều chiến lược tạo thuốc điều trị đặc hiệu HER2. Điều trị độc tố miễn dịch là hướng điều trị có nhiều triển vọng được các nhà khoa học đặc biệt quan tâm. Các độc tố miễn dịch được tạo ra bằng công nghệ gen là các phân tử có hai chức năng, chức năng nhận biết tế bào đích theo nguyên tắc liên kết kháng nguyên - kháng thể và chức năng làm tan tế bào đích do nửa độc tố của phân tử. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả tạo phân tử độc tố miễn dịch ScFv bao gồm phần biến đổi của kháng thể đặc hiệu HER2 và phần độc tố là peptide melittin có nguồn gốc từ ong mật *Apis cerana*. Gen tái tổ hợp tạo ra được gọi là *hermel* được gắn vào vector biểu hiện pET-21a(+), sau đó biểu hiện trong chủng *E. coli Rosetta* ở 28°C và cảm ứng với 0,6 mM IPTG. Sản phẩm biểu hiện của gen được tinh sạch trên cột Ni-NTA.

**Từ khóa:** Độc tố miễn dịch, kháng thể đơn chuỗi, *hermel*, HER2, melittin.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự biểu hiện quá mức thụ thể HER2, p185 kDa, do tăng phiên mã oncogene HER2 (ErbB-2), một trong bốn thành viên của họ thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (EGFR) ở giai đoạn sớm của ung thư vú được coi như một chỉ thị để chẩn đoán và đích điều trị vì sự biểu hiện quá mức HER2 có tiên lượng rất xấu với các dấu hiệu như di căn sớm và suy giảm mạnh thời gian sống sót của bệnh nhân (Serenella Eppenberger - Castori, 2007).

Mặc dù HER2 không có các ligand nhưng khi trùng hợp với các thành viên khác của họ thụ thể này thì khả năng truyền tín hiệu của thụ thể này lại rất mạnh (Moasser, 2007; Carney1, 2007). Biểu hiện quá mức HER2 trong các tế bào tuyến vú kích thích sự phân chia tế bào, làm thay đổi hình dạng tế bào, phát triển khối u và dẫn đến các biến đổi kháng apoptosis (Serenella, 2001). Các công trình nghiên cứu trước chỉ ra rằng có khoảng 25 - 30% bệnh nhân ung thư vú được phát hiện có sự biểu hiện quá mức protein HER2, do tăng số lượng gen hoặc do tăng phiên mã, và tế bào khối u có thể có tới 2 triệu thụ thể HER2 bộc lộ trên bề mặt (Venter, 1987). Các bằng chứng lâm sàng cũng cho thấy biểu hiện quá mức HER2 là dấu hiệu của nguy cơ cao ung thư vú di căn và suy giảm tỷ lệ sống sót của bệnh nhân (Moasser, 2007). Hiện nay, thuốc điều trị có bản chất kháng thể kháng HER2 đã được Tổ chức quản lý thuốc và dược phẩm Mỹ (FDA) phê chuẩn cho ứng dụng là Herceptin (Harries, 2002).

Tuy nhiên, một trong những liệu pháp mới đang được quan tâm là sự kết hợp giữa phân tử kháng thể hướng đích điều trị với phân tử gây độc tế bào. Độc tố miễn dịch (Immunotoxin) là phân tử tái tổ hợp được cấu tạo bởi 2 phần: phần hướng tới tế bào đích có bản chất kháng thể và phần độc tính có tác dụng gây độc tế bào. Phần này có thể là các protein gây độc tế bào; ức chế quá trình sinh tổng hợp của tế bào; hoặc các peptide làm tan tế bào. Các immunotoxin được xem là có tiềm năng ứng dụng trong điều trị ung thư. Với hướng phát triển đó, chúng tôi đã lựa chọn melittin để tạo phân tử immunotoxin sử dụng trong điều trị ung thư vú. Melittin là một peptide gồm 26 amino acid, chiếm 50% trọng lượng khô của nọc ong, có khả năng phá hủy tế bào do phá vỡ cấu trúc màng tế bào (Yolanda, 1997). Gen mã hóa cho immunotoxin được tạo ra bằng công nghệ gen bao gồm phần gen mã hóa kháng thể đơn chuỗi đặc hiệu HER2 và phần gen mã hóa melittin đã được tách dòng trong công trình trước đây (Lê Quang Huấn, 2004).

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Chủng và môi trường nuôi cấy

Chủng *E. coli* TOP10 (Invitrogen) được sử dụng làm vật chủ trong thao tác DNA và được nuôi trong môi trường Luria-Bertani (1% tryptone, 1% NaCl, 0,5% yeast extract và 1,5% agar đối với môi trường thạch) có bổ sung 100 µg/ml ampicillin để chọn lọc

các thể biến nạp. Chủng *E. coli* Rosetta (Novagen) được sử dụng làm vật chủ biểu hiện gen mã hóa độc tố miễn dịch *hermel*, được nuôi trong môi trường LB có bổ sung 100 µg/ml ampicillin và 34 µg/ml chloramphenicol. Gen mã hóa độc tố miễn dịch đã được tách dòng và gắn vector tách dòng TOPO PCR<sup>#</sup> 2.1. Vector biểu hiện pET21-a(+) (Invitrogen), các enzyme hạn chế *EcoRI* và *NotI*, ligase (New England Biolab), các hóa chất khác đều là những hóa chất tinh khiết sử dụng trong sinh học phân tử.

**Phương pháp**

Sử dụng thư viện Griffin.1 ((Trung tâm Công nghệ protein của Vương Quốc Anh) bao gồm khoảng 1,2.10<sup>9</sup> dòng phagemid pHEN2 mang các mảnh kháng thể scFv khác nhau trong vi khuẩn TGI để sàng lọc thu nhận phần kháng thể của độc tố miễn dịch, cụ thể như sau: kháng nguyên HER2 được pha loãng trong PBS (10 - 100 ng) sau đó được phủ trên đĩa polystyrene qua đêm ở nhiệt độ phòng; đĩa được phủ tiếp với dung dịch MPBS 2% sữa tách bơ và ủ ở 37°C trong 2 h; rửa đĩa bằng PBS 3 lần sau đó cho hỗn hợp thư viện phage vào các giếng; ủ đĩa 37°C trong 2 h. Sau đó rửa 10 lần bằng dung dịch TPBS (0,05% Tween 20 pha trong PBS), rửa tiếp 10 lần với dung dịch PBS. Các phage gắn với kháng nguyên được giải hấp phụ bằng 1 ml triethylamine 100 mM trong 10 phút ở nhiệt độ phòng sau đó trung hoà bằng 0,5 ml Tris-HCl, pH = 7,5. Dung dịch phage giải hấp phụ được ly tâm 10.000 v/p, thu dịch ly tâm. Dịch ly tâm này chứa các phage mang mảnh kháng thể gắn đặc hiệu với kháng nguyên HER2. Các phage sau mỗi vòng sàng lọc sẽ được nhân nuôi trong tế bào TGI để phục vụ cho các vòng sàng lọc tiếp theo. Sau lần sàng lọc thứ 3 chọn lọc ngẫu nhiên các khuẩn lạc, xác định ái lực với kháng nguyên HER2 bằng ELISA với kháng thể cộng hợp kháng M13.

Kháng thể phage có ái lực cao được xác định trình tự nucleotide và được gen này được gắn với gen mã hóa peptide melittin tạo gen tái tổ hợp mã hóa cho độc tố miễn dịch và được gọi là gen *hermel*. Gen *hermel* được gắn vào vector biểu hiện với cặp môi sau:

Anti-HER2F: 5'- TGGCGCCTCATGGACTG CCCTTACGGACCAAAG -3';

Anti-HER2R: 5'- ACCCGGGTACGGTAACC AAAGTACCTTGACC -3'.

Biến nạp vector mang gen *hermel* vào chủng biểu hiện *E. coli* Rosetta: Các plasmid tái tổ hợp mang gen

tạo ra được biến nạp vào *E. coli* chủng Rosetta (Novagen) bằng phương pháp sốc nhiệt (42°C, thời gian 90 giây). Các khuẩn lạc tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường LB đặc có bổ sung thêm chloramphenicol (34 µg/ml) và ampicillin (100 µg/ml).

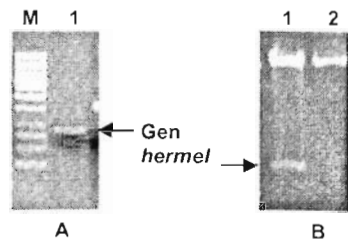
Biểu hiện gen mã hóa *hermel*: Khuẩn lạc trên đĩa chọn lọc LB được nuôi qua đêm trong môi trường LB lỏng có bổ sung 2 kháng sinh như trên. Khi OD của dịch nuôi cấy đạt 0,7, các tế bào được cảm ứng với 0,6 mM IPTG và 1% glucose và được nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở điều kiện nhiệt độ 28°C. Mẫu đối chứng là tế bào không cảm ứng IPTG và glucose. Thu tế bào ở thời điểm 3 h và 5 h để kiểm tra khả năng biểu hiện của gen *hermel*. Tinh sạch độc tố miễn dịch *hermel* bằng sắc ký trên cột Nickel theo quy trình của nhà sản xuất (Invitrogen).

**KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

**Thiết kế vector mang gen *hermel***

Vector pET-21a(+) được cắt bằng enzyme hạn chế tại 2 vị trí nhận biết của enzyme *EcoRI* và *NotI*, gen mã hóa độc tố miễn dịch *hermel* trong vector tách dòng TOPO PCR<sup>#</sup>2.1 cũng được cắt bằng 2 enzyme trên. Sản phẩm cắt được tinh sạch bằng điện di trên gel agarose 0,8% (Hình 1), sau đó được gắn vào vector biểu hiện pET-21a(+) bằng T4-DNA ligase (BioLabs).

Sau khi gắn, sản phẩm được biến nạp vào *E. coli* chủng TOP10. Các khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp được chọn lọc trên đĩa môi trường LB đặc có bổ sung ampicillin (100 µg/ml) và được nuôi trong môi trường LB lỏng (có chứa ampicillin), plasmid DNA sau đó được tách ra để kiểm tra sự có mặt của gen mong muốn bằng PCR với cặp môi Anti-HER2F và Anti-HER2R.



**Hình 1.** A. Tinh sạch gen mã hóa độc tố miễn dịch trên gel agarose 0,8%. M. Chỉ thị phân tử DNA; 1. Sản phẩm cắt vector tách dòng bằng *EcoRI* và *NotI*. B. Kiểm tra kết quả thiết kế vector biểu hiện gen *hermel*. 1, 2. Các plasmid cắt bằng enzyme *EcoRI* và *NotI*.

Sản phẩm thô gel (Hình 1A) được gắn vào vector pET21-a(+) cũng đã được cắt với 2 enzyme *EcoRI* và *NotI*. Sản phẩm gắn kết được biến nạp vào *E. coli* chủng DH5 $\alpha$ , sau đó tách plasmid để kiểm tra kết quả gắn kết. Kết quả cắt kiểm tra plasmid (vector biểu hiện mang gen mã hóa immunotoxin) bằng các enzyme *EcoRI* và *NotI* được trình bày trên hình 1B.

Kết quả này còn được khẳng định bởi việc xác định trình tự nucleotide của gen *hermel* sau khi được gắn vào vector biểu hiện pET-21a(+) tại các vị trí nhận biết của enzyme *EcoRI* và *NotI*. Gen *hermel*

chứa các vùng chức năng cũng như mã khởi đầu, mã kết thúc theo đúng thiết kế (xem phần phân tích trình tự dưới đây). Trình tự gen *hermel* đã được đăng ký trong Ngân hàng gen quốc tế với mã số: AM402973. Plasmid chứa gen *hermel* sau khi xác định trình tự được tinh sạch và biến nạp vào *E. coli* chủng Rosetta để biểu hiện gen tái tổ hợp ở nhiệt độ 28°C sau 3 h cảm ứng 0,6 mM IPTG.

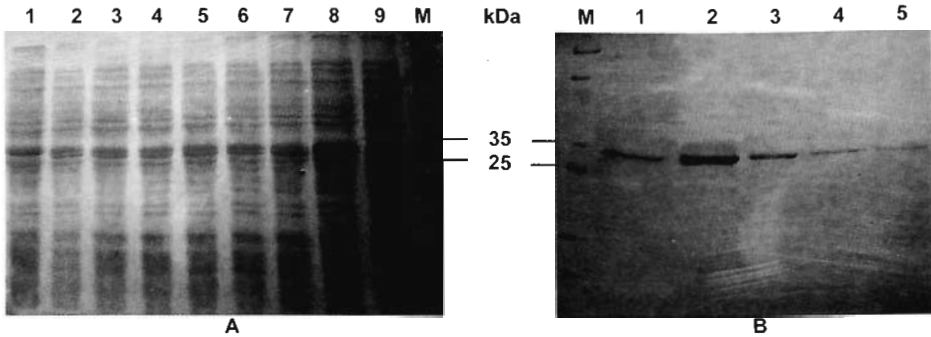
Kết quả cho thấy protein tái tổ hợp hermel (~32 kDa) có xuất hiện trong dịch phá tế bào ở tất cả các mẫu sau cảm ứng (Hình 3).

```

atggactgcccttacggaccaagaagaaagaggaaggtagggtggacagatccaatgactcagtcaccatcttct
M D C P Y G P K K K R K V G G Q I Q M T Q S P S S
gtatctgcttcagtcggagatagggttacaatcacttgcaaagcctcacaagatgtctcaatagtggtcgcatgg
V S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W
tatcaacagaaacctggtaagggcccctaagttggtgatctactcagcctatcacagatcacccggagtaccatca
Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S
aggttctcaggttctggatcaggtactgactttaccttgaccatttcatcattgcagccagaggattttgcaacc
R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T
tattattgccagcaatactacatctaccccttacaccttcggacaaggaacaaaagttgagattaagtcacaggt
Y Y C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K S S G
ggaggaggttcaggtggaggaggttctggaggtgaagtacaattagtcgaatcaggaggtgggtttggttcaacct
G G G S G G G G S G G E V Q L V E S G G G L V Q P
ggaggatcattaaggttgtcttgtgacatctggtttcacattcaccgattacacaaatggattgggttagacag
G G S L R L S C A A S G F T F T D Y T M D W V R Q
gccctggaagggtttggagtggtgcgcgacgtcaaccctaattctggtggatcaatctataaccagagattc
A P G K G L E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F
aagggaaggttcaccttgtcagtggtataggtctaagaacacctgtatttgcagatgaactcattgagggctgag
K G R F T L S V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E
gatacagccgtttactactgtgccagaaatttgggaccttcttctacttcgactactggggtcaaggtactttg
D T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L
gttacogtatcttcaggtattggagctgtattgaaagtcttaaccaccggttgcctgccttgatattctgggatc
V T V S S G I G A V L K V L T T G L P A L I S W I
aagaggcagaggcagcagcaccaccatcatcaccatgcccgcggaat taa
K R Q R Q Q H H H H H H A A A N *

```

Hình 2. Trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của gen *hermel*.



**Hình 3.** Kết quả điện di SDS-PAGE. A. 1. Trước cảm ứng; 2 - 9 mẫu sau cảm ứng với IPTG sau 3 h; M. Protein marker (SM0431, Fermentas). B. 1 - 5. Các phân đoạn sau khi tinh sạch trên cột Ni-NTA.

### BÀN LUẬN

Mục đích cuối cùng của nghiên cứu này là tạo ra phân tử độc tố miễn dịch có khả năng nhận biết và làm tan tế bào ung thư vú biểu hiện mạnh thụ thể HER2, tức là tạo ra phân tử hướng đích. Vì vậy, gen tái tổ hợp *hermel* được tạo ra gồm có phần hướng đích, là phần kháng thể đặc hiệu thụ thể HER2 và phần làm tan tế bào, phần melittin. Phần kháng thể được tạo ra bằng kỹ thuật phage display bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và vùng biến đổi của chuỗi nặng được nối với nhau bằng liên kết linh động SSSGGGGSSGGSSGG và phần kháng thể được nối với phần làm tan tế bào, melittin bằng một liên kết linh động khác có kích thước ngắn là LVTVSS và đuôi His-Tag phục vụ cho việc tinh sạch sản phẩm trên cột ái lực. Gen *hermel* được xác định lại trình tự nucleotide sau khi gắn vào vector biểu hiện pET-21a(+) cho thấy các phần chức năng đã được lắp ráp vào vector biểu hiện đúng theo thiết kế.

Phân tích việc sử dụng các bộ mã cho thấy trong gen *hermel* chứa nhiều mã bộ ba ít được sử dụng trong *E. coli* như GGA (Gly), GGT (Gly), ATC (Ile)... Vì vậy, chúng tôi chọn chủng *E. coli* Rosetta để biểu hiện gen *hermel* do chủng này chứa các bộ mã hiếm mà chủng *E. coli* BL21 và các chủng *E. coli* biểu hiện khác không có, hơn nữa, chủng *E. coli* Rosetta còn chứa các plasmid như pRARE và pRIG nên có nhiều bản sao của các gen tRNA tương ứng cho các bộ mã hiếm. Do đó, sự biểu hiện của protein tái tổ hợp có thể tăng (Novy, 2001). Một trong những điểm lưu ý là sự sinh trưởng của tế bào biểu hiện sau khi cảm ứng IPTG: sinh khối tế bào trong môi trường cảm ứng IPTG giảm mạnh so với sinh khối tế bào trong môi trường nuôi cùng không cảm ứng và sau 5 h cảm

ứng dịch nuôi tế bào trở nên trong suốt, trong khi đó ở bình không cảm ứng sinh khối tế bào vẫn tăng và đạt bão hòa. Điều này có thể do sự làm tan tế bào của melittin khi nó được tổng hợp.

Độc tố miễn dịch nhận được có độ tinh sạch rất cao vì chỉ xuất hiện một băng protein duy nhất khi điện di trên gel polyacrylamid (Hình 3).

### KẾT LUẬN

Thiết kế thành công vector biểu hiện gen *hermel* mã hóa độc tố miễn dịch bao gồm phần mã hóa kháng thể nhận biết thụ thể HER2 trong ung thư vú và phần mã hóa peptide làm tan tế bào melittin.

Biểu hiện thành công gen *hermel* trong *E. coli* chủng Rosetta ở nhiệt độ 28°C sau khi cảm ứng với 0,6 mM IPTG và 1% glucose. Độc tố miễn dịch nhận được có độ tinh sạch rất cao sau khi tinh sạch trên cột ái lực.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài KC-10.09/06.10 và trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen của Viện Công nghệ sinh học.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Lê Quang Huân (2004) Sử dụng phương pháp PCR lồng để tách dòng gen melittin. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 42(1): 55-61.
- Carney WP, Leitzel K, Ali S, Neumann R, Lipton A (2007) HER-2/neu diagnostics in breast cancer. *Breast Cancer Res* 9: 207-212.

Harries M, Smith I (2002) The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocrine-Related Cancer* 9: 75-85.

Moasser MM (2007) The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 26: 6469-6487

Novy R, Drott D, Yaeger K, Mierendorf R (2001) Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. In *Novations* 12: 1-3.

Serenella Eppenberger-Castori, Willy K, Christopher B (2007) Prognostic and predictive significance of ErbB-2

breast tumor levels measured by enzyme immunoassay. *J Clin Oncol* 19: 645-656

Venter DJ, Tuzi NL, Kumar S, Gullick WJ (1987) Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification. *Lancet* 2: 69-72.

Yolanda C, Mahendra KJ (1997) Synergism between mellitin and phospholipase A<sub>2</sub> from bee venom: Apparent activation by intervesicle exchange of phospholipids. *Biochemistry* 36(13): 3882-3893.

## CONSTRUCTION OF EXPRESSION VECTOR OF IMMUNOTOXIN ANTI-HER2-MELITTIN (*HERMEL*) IN *E. COLI*

Nguyen Thi Thanh Diu, La Thi Huyen, Phan Minh Tuan, Le Quang Huan\*

*Institute of Biotechnology*

### SUMMARY

Since the discovery that the receptor HER2 (erbB2/neu) was overexpressed in 20 - 30% of breast cancers, and its subsequent association with poor prognosis, there has been many therapeutic strategies designed to fight against this kind of breast cancer. Immunotoxin therapy is one of a growing number of treatments in which scientists engineer molecules to target cancer cells and leave healthy cells unharmed. This hybrid molecule which is created by coupling an antigen or an antibody with all or part of a toxin combines the specificity of the antibody or antigen with the toxicity of the toxin. In this study we engineered an immunotoxin constituted by ScFv antiHER2 antibody and melittin, a cytotoxin originated from honey bee *Apis cerana*. The aim was to produce an immunotoxin having properties in specific recognition and lysis of the breast cancer cells overexpressing HER2. By using the methods in molecular biology, fusion of scFv anti-HER2 and melittin, was obtained from the cloning strain *E. coli* TOP10 in our previous study. The fusion gene, namely *hermel*, was excised into pET-21a(+) expression vector (purchased from Invitrogen) and subsequently expressed in *E. coli* *Rosetta* (purchased from Novagen). Recombinant vector containing *hermel* gene was successfully designed. The sequence of *hermel* gene was registered with the code AM402973 in the GeneBank. The recombinant protein *hermel* was successfully overexpressed in *E. coli* *Rosetta* at a condition of 28°C and 0.6 mM IPTG, harvesting at 3 h after induction. The expressed immunotoxin with the size of 291 amino acids and molecular weight of approximately 32 kDa was purified by using Ni-NTA column (under the protocol of Invitrogen). Optimization in expression condition should be continuously studied in order to increase the yield of the expressed protein that can be subsequently subject to biological activity investigations and clinical trials.

**Keywords:** Immunotoxin, *hermel*, melittin, anti-HER2 antibody

\* Author for correspondence: Tel: 84-4-62928397; Fax: 84-4-38363144; E-mail: [huanlequang@gmail.com](mailto:huanlequang@gmail.com)