

УДК 577(112+354.9)+57(085.2+086.164)+ 616-006.6

ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО АНАЛОГА СЕКРЕТОРНОЇ ФОРМИ НВ-EGF ЛЮДИНИ ТА ОЦІНКА ПЕРСПЕКТИВ ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ В БІОТЕХНОЛОГІЇ

Н. В. Короткевич
Д. В. Колибо
А. Ю. Лабинцев
С. І. Романюк
С. В. Комісаренко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: gnr.nata@gmail.com

Отримано рекомбінантний аналог секреторної форми гепаринзв'язувального фактора росту людини (sHB-EGF), що подібний до епідермального фактора росту, і досліджено його функціональну активність, а також можливість створення на його основі тест-системи для виявлення дифтерійного токсину (ДТ). Показано здатність одержаного sHB-EGF зв'язувати ДТ і гепарин, а також стимулювати *in vitro* проліферацію клітин лінії ЗТЗ, що походить з фібробластів мишей лінії Balb/c. Константа афінності рекомбінантного sHB-EGF до ДТ, розрахована за методом Фріге, становила $1,67 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, що відповідає константі афінності природної форми рецептора. Рекомбінантний sHB-EGF було використано замість перших антитіл в імуоензимному «сендвіч»-аналізі для виявлення ДТ. Чутливість розробленого методу становила 1,9 нг/мл. Отриманий біотехнологічний продукт може набути застосування як компонент тест-систем для діагностики дифтерії або лікарських засобів для стимуляції регенеративних процесів, а також як реагент для фундаментальних досліджень.

Ключові слова: гепаринзв'язувальний фактор росту, що подібний до епідермального фактору росту людини, секреторна форма, рекомбінантний протеїн, тест-система, дифтерійний токсин.

Гепаринзв'язувальний фактор росту, що подібний до епідермального фактора росту (HB-EGF), належить до родини епідермальних факторів росту. Вперше його було виявлено в культуральному середовищі клітин гістоцитарної лімфоми людини U937. Трансмембранну форму HB-EGF називають **pro-HB-EGF**, підкреслюючи при цьому, що вона є попередником розчинної форми. У структурі pro-HB-EGF виділяють пропептид, а також гепаринзв'язувальний, EGF-подібний, юкстамембранний, трансмембранний та цитоплазматичний домени [1]. Саме EGF-подібний домен відповідає за зв'язування HB-EGF з рецепторами HER-1 та HER-4 (від англ. *human epidermal growth factor receptors*) на поверхні клітин, а також за взаємодію з дифтерійним токсином [2].

Pro-HB-EGF у результаті опосередкованого металопротеїназами процесингу може переходити в розчинну форму (sHB-EGF — від англ. *soluble* розчинний), яка має масу

від 14 до 19 кДа [1, 3, 4] і складається з гепаринзв'язувального та EGF-подібного доменів. Основну роль у процесі утворення розчинної форми HB-EGF відіграють металопротеїнази класів MMPs (matrix metalloproteinases) та ADAMs (a disintegrin and metalloproteinases), а саме ADAM 9, 10, 12, 17 [5–8].

Виділяють три основні механізми реалізації біологічної активності HB-EGF — аутокринна, паракринна та юкстакринна регуляція. Існують дані про різну біологічну активність мембрано-заякореної та розчинної форм HB-EGF. Так, pro-HB-EGF виступає як антагоніст мітогенного впливу sHB-EGF та EGF і здатен індукувати контактзалежне пригнічення росту та апоптоз у культурі клітин. Вважають, що такий вплив не пов'язаний з конкуренцією pro-HB-EGF та sHB-EGF за рецептор. Можливим поясненням цього факту може бути олігомеризація pro-HB-EGF, а також асоційованих з ним протеїнів на мембрані клітин, що, у свою

чергу, може спричинювати олігомеризацію рецепторів (HER-1 або HER-4) у разі зв'язування з олігомерним pro-НВ-EGF. До такого олігомерного комплексу рецепторів можуть долучатися сигнальні молекули, які беруть участь у пригніченні поділу клітин та індукції апоптозу [9].

Мітогенна активність sНВ-EGF значно посилюється асоційованими з мембраною гепарансульфатпротеогліканами (HSPG), оскільки взаємодія N-кінцевої гепаринзв'язувальної ділянки НВ-EGF з HSPG призводить до стабілізації EGF-подібного домену молекули у комплексі з рецептором [10, 11, 12].

Експресію гена НВ-EGF було виявлено в ряді тканин, особливо в легенях, серці, мозку та скелетній мускулатурі [13]. Високий рівень експресії НВ-EGF також виявлено в клітинах деяких пухлин, що може вказувати на важливу роль цього фактора росту в процесах канцерогенезу [14]. Окрім того, розчинна форма НВ-EGF є потенційним мітогеном та хемоатрактантом для кератиноцитів, гепатоцитів, клітин гладкої мускулатури та фібробластів [1, 10, 15].

Pro-НВ-EGF також виступає в ролі рецептора для ДТ — основного фактора патогенності збудника дифтерії *Corynebacterium diphtheriae* [2]. У структурі ДТ виділяють дві субодиниці: рецепторзв'язувальну — В (від англ. *binding*) та ензиматично-активну — А (від англ. *active*). Субодиниця В токсину (SbВ) відповідає за зв'язування з pro-НВ-EGF і забезпечує на наступних етапах транспортування до цитозолу клітини субодиниці А токсину (SbА), яка, у свою чергу, здійснює АДФ-рибозилування еукаріотичного фактора елонгації трансляції 2 (eEF-2), що призводить до зупинки синтезу протеїну та загибелі клітини [16, 17].

Розчинному НВ-EGF (sНВ-EGF), як і його трансмембранному попередникові (pro-НВ-EGF), притаманні не тільки мітогенні властивості, але й здатність взаємодіяти з ДТ. Тому рекомбінантні аналоги sНВ-EGF, імовірно, можуть бути використані як антидоти проти дифтерії, однак при цьому слід пам'ятати, що завдяки своїй мітогенній активності вони можуть справляти небажаний вплив на організм. Тому для створення таких антидотів використовують мутантні форми НВ-EGF, які не мають мітогенної активності [18]. Крім того, рекомбінантні аналоги sНВ-EGF можна розглядати як компоненти тест-систем для визначення ДТ *in vitro* в імуноензимному лігандрецепторному аналізі, заснованому на специфічній взаємодії ДТ з sНВ-EGF.

На сьогодні основними підходами для визначення ДТ є біологічні тести на чутливих тваринах або клітинах та імунологічні методи. Оскільки біологічні тести ґрунтуються на визначенні токсичності ДТ, тобто його функціональної активності, вони є «золотим стандартом» для виявлення токсину. Принцип імунологічних методів для визначення ДТ базується на реєстрації специфічної взаємодії поліклональних або моноклональних антитіл з токсином. Імунологічні тести для виявлення ДТ в сироватках крові хворих на дифтерію або в середовищах клінічних ізолятів *C. diphtheriae* здатні замінити біологічні тести на чутливих тваринах або клітинах, оскільки вони мають низку переваг. Найбільш досконалими імунологічними методами виявлення ДТ є імуноензимний (ІЕА) та імунохроматографічний аналізи, які характеризуються високою чутливістю і специфічністю, потребують набагато менше часу для проведення та значно дешевші за біологічні тести [19].

Як правило, у тест-системах на основі ІЕА використовують поліклональну сироватку коней для захоплення ДТ і моноклональні антитіла проти субодиниці А токсину, кон'юговані з ензимом, для визначення зв'язаного ДТ. Існуючі на сьогодні методи на основі ІЕА дозволяють виявляти ДТ в межах від 1 до 10 нг/мл. Раніше нами було розроблено імуноензимні тест-системи з використанням поліклональних антитіл коня для захоплення і детекції ДТ, які дозволяли виявляти токсин у мінімальній концентрації 1 нг/мл [20]. Найкращі з імуноензимних тест-систем дозволяють виявляти до 0,1 нг/мл токсину і потребують близько 3 год для проведення аналізу [21]. Імунохроматографічні тест-системи працюють за аналогічним принципом, але моноклональні антитіла проти субодиниці А кон'юговані не з ензимою міткою, а з колоїдним золотом чи іншою корпускулярною міткою. Найкращі з імунохроматографічних тест-систем дозволяють виявляти до 0,5 нг/мл, а час проведення тесту становить 10 хв [22].

Отже, імуноензимні та імунохроматографічні тест-системи є високоспецифічними, чутливими, стабільними протягом тривалого проміжку часу, простими у використанні, не потребують висококваліфікованого персоналу і відносно дешеві. Проте за допомогою таких тестів неможливо відрізнити функціонально-активний токсин від неактивного, оскільки в основу їхньої дії покладено визначення антигенних властивостей ДТ, а не його біологічної активності. Нами

запропоновано новий комбінований підхід, що базується на виявленні рецепторзв'язувальної активності ДТ у поєднанні з імунологічними підходами для детекції лігандрецепторного комплексу. Так, для зв'язування ДТ можна використати рекомбінантний аналог розчинної форми його рецептора — sHB-EGF, а для детекції комплексу токсину з рецептором — специфічні до ДТ F(ab')₂-фрагменти поліклональних антитіл коня. Такий підхід зберігає всі переваги імуноензимних тест-систем, а також дозволяє визначати наявність ДТ з рецепторзв'язувальною активністю.

Тому метою цієї роботи було отримати рекомбінантний аналог секреторної форми HB-EGF людини (sHB-EGF) і дослідити його функціональну активність, а також можливість створення на основі sHB-EGF тест-системи для виявлення ДТ. З огляду на вищезазначене можна припустити, що рекомбінантний аналог sHB-EGF людини є потенційним біотехнологічним продуктом з численними можливостями застосування в різних галузях. Рекомбінантний sHB-EGF може виявитись перспективним не тільки для створення нових імуноензимних тест-систем для виявлення ДТ у сироватках крові хворих на дифтерію або в культуральному середовищі коринебактерій, але й, можливо, у майбутньому ввійде до складу лікарських препаратів, що стимулюють регенерацію, а також застосовуватиметься у наукових дослідженнях, спрямованих на вивчення тонких молекулярних механізмів реалізації біологічної активності sHB-EGF.

Матеріали і методи

Матеріали. У роботі було використано такі реактиви: культуральне середовище RPMI-1640 з L-глутаміном, фетальну сироватку великої рогатої худоби, пеніцилін-стрептоміцин, амфотерицин (антимікотик), TRI-реагент для виділення тотальної РНК з клітин, праймери, імідазол, кон'югат моноклональних антитіл проти гістидинового тегу з пероксидазою хрому, діамінобензидинтетрагідрохлорид (ДАБ), гепарин 17 19 кДа, живильне середовище LB, диметилформамід (ДМФА), кон'югат стрептавідину з полімерною пероксидазою хрому, ортофенілєндіамін (ОФД), гепарин-агарозу, дитіотреїтол (ДТТ), кон'югат антитіл кози проти імуноглобулінів миші з пероксидазою (Sigma, США), Ni-NTI-агарозу (Qiagen, ФРН), зворотну транскриптазу M-MuLV, оліго д(Т) 12 18, RiboLock RNase інгібітор, MgCl₂,

полімераза Taq, воду без нуклеаз (Nuclease free water), ендонуклеази рестрикції BamHI, XhoI та HincII (HindII), ДНК-лігазу T4, фрагмент Кленова ДНК полімерази I *E. coli*, фосфатазу, набір для виділення ДНК, ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозид (IPTG), X-Gal, протеїнові маркери молекулярної маси в діапазоні від 10 до 180 кДа, ДНК-маркери молекулярної маси в діапазоні від 100 до 10 000 п.н. (Fermentas, Литва), дезоксирибонуклеотидтрифосфати (dNTPs) (Amersham, США), протидифтерійну сироватку («Біолік», Україна), нітроцелюлозу Hibond C-Extra (Amersham, США).

У дослідженнях застосовували рекомбінантну субодиноцю В (SbV), отриману зі створеного нами раніше штаму-продуцента [23]. Експресію та виділення SbV проводили згідно з протоколами та рекомендаціями, описаними у вищезазначеній публікації. ДТ було виділено з культурального середовища дифтерійних бактерій штаму Park-Williams-8 та люб'язно надано проф. Ю. Л. Радавським (Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України).

Обладнання: ультразвуковий дезінтегратор Labsonic M (Sartorius, ФРН), електроблотер Hoefer™ TE77 (Amersham, США), електропоратор Eppendorf 2510 (Eppendorf, ФРН), мікропланшетний ридер Microplate Reader Model 450 (BIO-RAD, США).

Культивування клітин евкаріотів. Клітинну культуру гістоцитарної лімфоми людини U937 було одержано з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Для отримання кДНК гена HB-EGF у роботі було використано культуру клітин гістоцитарної лімфоми людини U937. Клітини культивували за стандартних умов у культуральному середовищі RPMI-1640 з додаванням 5% -ї сироватки ембріонів телят за 5% -ї концентрації CO₂ в атмосфері.

Виділення тотальної РНК з культури клітин гістоцитарної лімфоми людини U937. Для виділення тотальної РНК з клітин використовували TRI-реагент (Sigma, США). Процедура виділення проводили згідно з рекомендаціями виробника. Наявність домішок протеїну або фенолу перевіряли, виходячи зі співвідношення оптичного поглинання на довжинах хвиль 260 нм /280 нм.

Реакція зворотної транскрипції з подальшим проведенням полімеразної ланцюгової реакції (РЗТ-ПЛР). РЗТ-ПЛР виконували за раніше описаною методикою [24]. Аналіз продукту ПЛР проводили в 1%-му

агарозному гелі. Очікуваний розмір продукту ПЛР — 267 п.н.

Створення генетичної конструкції pUC-19-sHB-EGF. Генетичну конструкцію було створено на основі вектора pUC-19 (Fermentas, Литва). Вектор pUC-19 послідовно обробляли ендонуклеазою рестрикції *HincII* (*HindII*) та фосфатазою. Отриману в ході проведення РЗТ-ПЛР кодувальну послідовність гена секреторної форми HB-EGF обробляли фрагментом Кленова ДНК полімерази I *E. coli*. Лінійну послідовність вектора та кодувальну послідовність гена секреторної форми HB-EGF об'єднували в єдину генетичну конструкцію за допомогою T4 ДНК-лігази. Клонування проводили за тупими кінцями. Усі вищезазначені маніпуляції з ДНК проводили, дотримуючись рекомендацій виробника. Клітини *E. coli* штаму DH10B трансформували генетичною конструкцією pUC-19-sHB-EGF методом електротрансформації [25] з наступним висіванням на тверде живильне середовище LB (триптон — 10 г/л, дріжджового екстракту — 5 г/л, NaCl 10 г/л, агару — 15 г/л), яке містило компоненти, необхідні для проведення синьо-білої селекції (X-Gal 20 мг/мл, IPTG 1 М) та селективний антибіотик ампіцилін у концентрації 0,005%.

Створення генетичної конструкції pET-28(a)-sHB-EGF на основі експресійного вектора та отримання клону-продуцента рекомбінантного аналога секреторної форми HB-EGF. Плазміди pUC-19-sHB-EGF та pET-28(a) (Novagen, ФРН) виділяли з клітин *E. coli* штаму DH10B (DE3) методом лужного лізису [26] та обробляли ендонуклеазами рестрикції *BamHI* і *XhoI*, сайти для яких присутні в полілінкерному сайті pET-28a(+) і фланкують нуклеотидну послідовність гена sHB-EGF у складі pUC-19. Гідролізовану ДНК розділяли в 1%-му агарозному гелі й виділяли необхідні фрагменти за допомогою набору для виділення ДНК (DNA Extraction Kit). Об'єднання нуклеотидної послідовності гена sHB-EGF та експресійного вектора pET-28a(+) проводили з використанням T4 ДНК-лігази. Лігування та рестрикцію виконували згідно з рекомендаціями виробника. Далі клітини *E. coli* штаму Rosetta (DE3) трансформували отриманою генетичною конструкцією pET-28(a)-sHB-EGF методом електропорації з наступним висіванням на тверде живильне середовище LB з додаванням селективного антибіотика канаміцину в концентрації 0,005%.

Визначення нуклеотидної послідовності генетичної конструкції pET-28(a)-sHB-EGF

здійснено компанією ЗАТ «Макрохім» (Київ, Україна).

Аналітична експресія секреторної форми HB-EGF. Клітини отриманого клону висівали в рідке живильне середовище LB з додаванням 2% глюкози та інкубували при 37 °С за інтенсивної аерації до досягнення культурою оптичної густини 0,5–0,7 за OD₆₀₀. Для індукції експресії рекомбінантного протеїну додавали ізопропіл-β-D-тіогалктопіранозид (IPTG) у концентрації 1мМ. Індукцію експресії здійснювали при 30 °С упродовж 3 год. Для проведення аналізу експресії протеїну готували розчинну та нерозчинну фракції з подальшим проведенням електрофорезу в ПААГ. Після нарощування 2 мл клітинної біомаси осаджували центрифугуванням за 10 000 г. Осад ресуспендували у ЗФР, концентруючи в 20 разів, та обробляли ультразвуковим дезінтегратором. Рештки клітин відокремлювали центрифугуванням за 10 000 г. При цьому супернатант містив розчинну фракцію протеїнів *E. coli*, у тому числі й цільового протеїну, а осад — нерозчинну. Клітинний осад промивали 1%-м Triton-X100 та ресуспендували у ЗФР.

Аналіз протеїнових фракцій проводили за допомогою електрофорезу в 10%-му ДСН ПААГ з використанням Tris-HCl-буферної системи з додаванням трицину [27]. Також було використано маркери молекулярної маси в діапазоні від 10 до 180 кДа. Проби для електрофорезу готували з додаванням буфера для зразків (40 мг ДСН, 0,48 г сечовини, 50 мкл β-меркаптотанолу, 1–2 мкл бромфенолового синього на 1 мл буферного розчину), які попередньо прогрівали протягом 20–30 хв при 70–75 °С.

Виділення рекомбінантного аналога sHB-EGF людини та процедура його очищення. Нарощення клітинної біомаси та індукцію експресії проводили за описаною вище методикою. Після цього клітинну біомасу осаджували центрифугуванням за 3 000 об/хв, осад ресуспендували в 5 мл буферного розчину, що містив 0,3 М NaCl, 20 мМ Tris-HCl, 1мМ DTT та 6 М сечовини (рН 8,0). Отриману клітинну біомасу обробляли ультразвуковим дезінтегратором. Залишки клітин відокремлювали центрифугуванням за 13 000 об/хв протягом 25 хв. Надосад наносили на колонку з Ni-NTI агарозою, попередньо врівноважену наведеним вище буферним розчином. Для проведення процедури рефолдингу колонку із сорбованим протеїном промивали буферними розчинами такого самого складу, які додатково містили 10 мМ імідазолу і,

відповідно, 8, 6, 4, 2 та 1М сечовини. Елюцію протеїну здійснювали 400 мМ імідазолом. З метою створення умов для формування дисульфідних зв'язків до елюйованого протеїну додавали відновлений та окиснений глутатіон у концентрації 6 мМ та 1,2 мМ відповідно. Реакційну суміш інкубували впродовж 4 год за 4 °С і наносили на гепарин-сефарозу, попередньо врівноважену буфером, що містив 20 мМ Tris-HCl, 5 мМ EDTA (рН 8,0). Перед нанесенням на колонку суміш протеїну розводили у 5 разів тим самим буфером. Після нанесення колонку промивали 10-ма об'ємами того самого буфера з додаванням 0,1 М NaCl. Елюцію протеїну проводили за допомогою 0,6 М NaCl. Для подальшого використання протеїн діалізували проти ЗФР (0,8% NaCl, 0,25% KCl, 0,144% Na₂HPO₄ і 0,024% KH₂PO₄, рН 7,2). Аналіз протеїнових фракцій в 10% -му ПААГ виконували за описаною вище методикою.

Вестерн-блот-аналіз. Перенесення протеїнів з ПААГ на нітроцелюлозу здійснювали за допомогою електроблотера. Нітроцелюлозну мембрану попередньо було витримано в буферному розчині для перенесення (25 мМ Tris-HCl, 0,1% ДСН, 20% метилового спирту, 192 мМ гліцину) протягом кількох хвилин. Після перенесення мембрану витримували в 1% -му розчині знежиреного молока в ЗФР упродовж 1 год при 37 °С. Після промивання нітроцелюлозну мембрану витримували за тих самих умов у розчині моноклональних антитіл проти гістидинового тегу, кон'югованих з пероксидазою хрому (в розведенні 1:10 000), в твін-фосфатному буфері (ТФБ). Проявлення нітроцелюлозної мембрани здійснювали протягом кількох хвилин у розчині для забарвлення, що містив 0,07% діамінобензидинтетрагідрохлориду (ДАБ) та 0,035% H₂O₂ в ЗФР.

Біотинілювання F(ab')₂-фрагментів антитоксичних антитіл коня. Очищені висолоюванням F(ab')₂-фрагменти антитоксичних антитіл коня з протидифтерійної сироватки діалізували проти 0,1 М Na-карбонатного буфера (рН 8,3). Розчин біотину в диметилформаміді (ДМФА) з концентрацією 1мг/мл додавали до антитіл краплями за інтенсивного перемішування та залишали на 1 год при кімнатній температурі. Після цього кон'югат діалізували проти ЗФР. Співвідношення антитіл до біотину за масою становило 4:1.

Непрямий твердофазний ІЕА. 96-лункові полістиролові планшети використовували для сорбції антигену (рекомбінантного sНВ-EGF, гепарину або F(ab')₂-фрагментів антитоксичних антитіл коня), який вносили

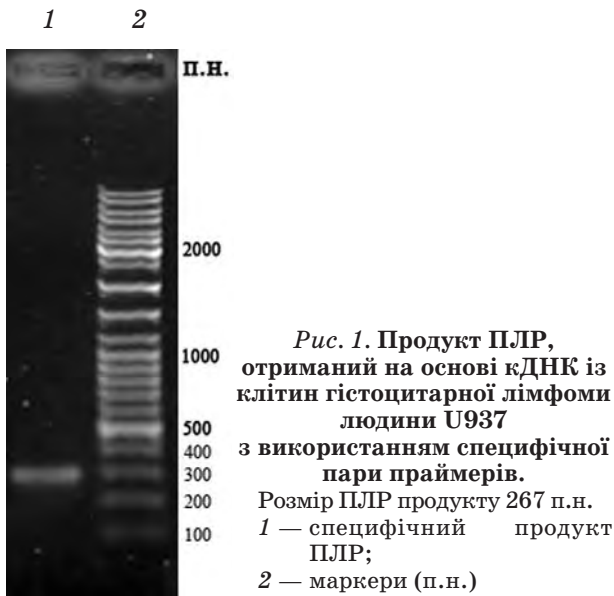
в ЗФР та інкубували протягом 1 год при 37 °С. Концентрація антигену становила 10 мкг/мл. Після внесення антигену вільні для сорбції протеїну сайти на планшеті блокували 1% -м розчином знежиреного сухого молока в ЗФР. Усі наступні компоненти вносили в ТФБ з подальшою інкубацією за аналогічних умов. Після кожної інкубації планшети тричі промивали водою. Далі послідовно вносили: рекомбінантну субодиницю В ДТ у серії розведень, біотинільовані F(ab')₂-фрагменти антитоксичних антитіл коня (в робочому розведенні 1:10 000) та стрептавідин, кон'югований з полімерною пероксидазою хрому (1:5 000). Наявність пероксидазної мітки виявляли шляхом інкубації протягом 20 хв при 37 °С у водному розчині хромоген-субстрату, який містив 0,05% ортофенілендіаміну (ОФД) та 0,03% H₂O₂. Реакцію зупиняли додаванням 50 мкл 2М H₂SO₄. Рівень сигналу оцінювали виходячи зі значень оптичної густини при довжинах хвиль 490 та 405 нм за допомогою мікропланшетного ридера.

Константу афінності рекомбінантного аналога sНВ-EGF людини до ДТ визначали за методом Фріге. Побудову графічних залежностей та необхідні математичні розрахунки проводили згідно з описаними підходами [28].

Результати та обговорення

Створення генетичної конструкції рЕТ-28(а)-sНВ-EGF та отримання клону-продукта рекомбінантного аналога секреторної форми НВ-EGF. ДНК-последовність гена, що кодує sНВ-EGF, було отримано з клітин лінії U937, яка походить з гістоцитарної лімфоми людини, за допомогою реакції зворотної транскрипції з подальшим проведенням ПЛР (рис. 1). Цю клітинну лінію було обрано як джерело нуклеотидної последовності sНВ-EGF для наступного клонування завдяки наявності високого рівня експресії НВ-EGF.

Отриману нуклеотидну последовність, що кодує sНВ-EGF, було клоновано за тупими кінцями у вектор рUC-19 з метою проведення синьо-білої селекції та подальшого відбору позитивних трансформантів для субклонування в експресійний вектор рЕТ-28(а)+. Як показали результати секвенування, последовність отриманої вставки відповідала очікуваній. Створеною генетичною конструкцією рЕТ-28(а)-sНВ-EGF було трансформовано клітини *E. coli* штаму Rosetta (DE3) для отримання клонів-продуктів рекомбінантного аналога секреторної форми НВ-EGF людини.



Аби забезпечити ефективне очищення та детекцію продукту, конструкцію вектора рЕТ-28(а)-sHB-EGF було розраховано таким чином, щоб очікуваний протеїновий продукт містив додаткову N-кінцеву послідовність з 31 амінокислоти, до складу якої входили His-tag та T7-tag, а також сайт розщеплення для тромбіну. Завдяки відповідному підбору праймерів отримана нами конструкція містила також додатковий залишок метіоніну між зазначеною N-кінцевою послідовністю та цільовим поліпептидом, що потенційно дозволяло використовувати метод бромціанового розщеплення протеїнів за метіоніном для відокремлення протеїну sHB-EGF від тегової 31 амінокислотної послідовності, оскільки цільова послідовність sHB-EGF не містить інших залишків метіоніну. Також нами було введено стоп-кодон перед послідовністю C-кінцевого полігістидинового тегу (рис. 2).



Рис. 2. Схематичне зображення протеїнового продукту — sHB-EGF людини, отриманого у бактерійній системі експресії:

Met — амінокислотний залишок метіоніну; T — сайт розщеплення тромбіном

Аналітична експресія з наступним виділенням рекомбінантного протеїну з використанням афінного сорбенту. Після трансформування клітин *E. coli* штаму Rosetta (DE3) генетичною конструкцією рЕТ-28(а)-

sHB-EGF серед трансформантів було відібрано клон для подальшого проведення аналітичної експресії sHB-EGF. Результати цих експериментів засвідчили, що цільовий продукт експресується переважно в нерозчинній формі у тільцях включення. Ці результати було підтверджено проведенням вестерн-блот-аналізу з використанням антитіл до полігістидинового тегу (рис. 3).

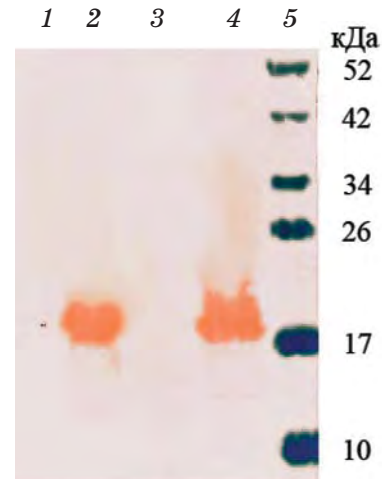


Рис. 3. Вестерн-блот-аналіз фракцій лізатів клітин клону-продуцента рекомбінантного аналога sHB-EGF людини після проведення аналітичної експресії:

1 — без індукції; 2 — тотальний лізат клітин; 3 — розчинна фракція; 4 — нерозчинна фракція; 5 — маркери молекулярної маси

При цьому внаслідок аномальної електрофоретичної рухливості sHB-EGF його молекулярна маса за даними електрофореграм та імуоблотингу була на 4,5 кДа вищою, ніж розрахована теоретично, й становила ~18 кДа замість 13,5 кДа. Аномальна електрофоретична рухливість, імовірно, пов'язана з наявністю багатої на лізин гепаринзв'язувальної ділянки у структурі sHB-EGF, яка за нейтральних значень рН несе позитивний заряд. Існують дані літератури, які підтверджують наявність аномальної електрофоретичної рухливості у молекул HB-EGF [29].

Протеїновий продукт з нерозчинної фракції виділяли в денатуруючих умовах з використанням афінного сорбенту Ni-NTI-агарози з подальшим проведенням рефолдингу шляхом зниження концентрації сечовини. Відновлювали дисульфідні зв'язки за допомогою суміші окисненого й відновленого глутатіону, яку додавали до препарату протеїну після попереднього етапу виділення. Для проведення наступних маніпуляцій з протеїновим продуктом здійснювали його

попередній діаліз проти ЗФР. Чистоту отриманого препарату перевіряли його електрофоретичним розділенням.

Перевірка здатності рекомбінантного sHB-EGF взаємодіяти з гепарином. Гепаринзв'язувальна ділянка бере активну участь у реалізації біологічної функції sHB-EGF. Здатність отриманого нами рекомбінантного аналога sHB-EGF взаємодіяти з гепарином перевіряли в непрямому ІЕА, в якому на поверхню лунок планшету сорбували гепарин, а зв'язаний sHB-EGF виявляли за допомогою антитіл проти полігістидинового тегу (рис. 4). Як показано, отриманий аналог sHB-EGF зберіг здатність взаємодіяти з гепарином. Саме тому для одержання чистішого препарату рекомбінантного sHB-EGF було використано наступний етап очищення протеїну за нативних умов на колонці з гепарин-сефарозою. Використання подвійної афінної хроматографії на сорбентах Ni-NTI-агарозі та гепарин-сефарозі дало змогу отримати високоочищений препарат sHB-EGF. При цьому вихід розчинного рекомбінантного протеїну становив 4,5 мг у перерахунку на 1 л бактеріальної культури (рис. 5).

Перевірка здатності рекомбінантного sHB-EGF взаємодіяти з нативним ДТ та рекомбінантним аналогом його рецепторзв'язувальної субодиниці В (SbB). Для дослідження перспективності використання отриманого аналога sHB-EGF як компонента тест-систем для виявлення ДТ і навіть як антидота проти токсину було важливо визначити, чи зберігає цей рекомбінантний протеїн здатність зв'язувати ДТ або його рекомбінантну субодиницю SbB.

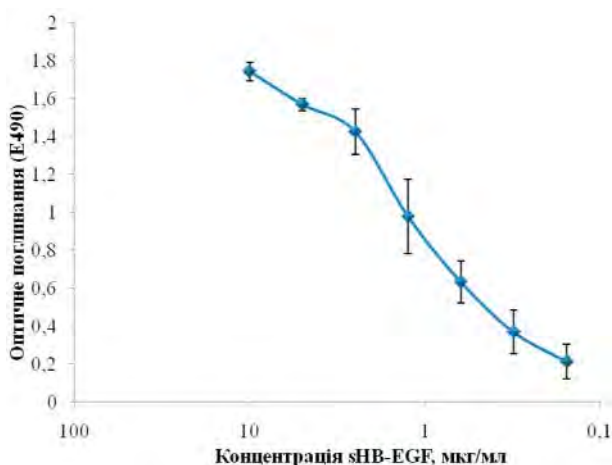


Рис. 4. Результати імуноензимного аналізу взаємодії рекомбінантного sHB-EGF з гепарином, сорбованим на планшети

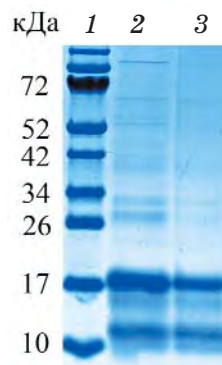


Рис. 5. Електрофореграма виділеного та очищеного рекомбінантного sHB-EGF людини: 1 — маркери молекулярної маси; 2 — sHB-EGF після попереднього виділення на афінному сорбенті; 3 — sHB-EGF після додаткового очищення на гепарин-сефарозі

Таку перевірку здатності до специфічної взаємодії рекомбінантного sHB-EGF з ДТ та рекомбінантним аналогом його рецепторзв'язувальної субодиниці В було проведено за допомогою непрямого імуноензимного аналізу. Отриманий нами рекомбінантний sHB-EGF було сорбовано на полістироловому планшеті для захоплення ДТ або SbB, а для виявлення комплексу sHB-EGF з антигеном використовували біотинільовані $F(ab')_2$ -фрагменти антитіл коня проти ДТ та стрептавідин, кон'югований з полімерною пероксидазою хрому. Результати проведеного ІЕА підтвердили здатність рекомбінантного sHB-EGF взаємодіяти як з нативним ДТ, так і з рекомбінантним аналогом його рецепторзв'язувальної субодиниці В. При цьому достовірний рівень сигналу детектували за концентрації ДТ 1,9 нг/мл та SbB близько 1 нг/мл (рис. 6). Більша чутливість виявлення рекомбінантної субодиниці В порівняно з природним ДТ, ймовірно, зумовлена різницею молекулярних мас зазначених антигенів та нестабільністю препарату нативного ДТ. Тому в більшості наступних дослідів рекомбінантну субодиницю В ДТ використовували як модельний антиген.

Визначення константи афінності рекомбінантного аналога sHB-EGF людини до нативного ДТ. Визначена за методом Фріге константа афінності (K_a) отриманого рекомбінантного аналога sHB-EGF людини до нативного ДТ становила $1,67 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ (значення константи дисоціації K_d $6 \cdot 10^{-9} \text{ M}$), що відповідає константі афінності природної форми рецептора [30]. Достатньо висока спорідненість рекомбінантного sHB-EGF до ДТ дозволяє використовувати одержаний рекомбінантний аналог секреторної форми

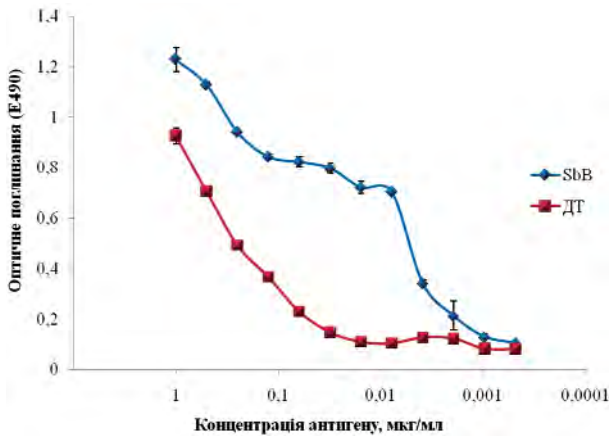


Рис. 6. Криві порівняльного визначення ДТ і його рекомбінантної субодиниці В у лігандрецепторному ІЕА з використанням рекомбінантного sHB-EGF, сорбованого на планшеті

HB-EGF людини під час створення імуоензимної тест-системи для специфічного виявлення ДТ у фізіологічних рідинах.

Порівняння чутливості виявлення субодиниці В ДТ за допомогою лігандрецепторного ІЕА з використанням sHB-EGF та класичного «сандвіч»-ІЕА. Для оцінки ефективності виявлення ДТ за допомогою запропонованого нами методу з використанням рекомбінантного sHB-EGF було проведено порівняльні дослідження чутливості виявлення рекомбінантної субодиниці В ДТ (як модельного антигену) за допомогою двох варіантів ІЕА. У першому варіанті (класичний «сандвіч»-ІЕА) як антитіла першого порядку використовували $F(ab')_2$ -фрагменти антитіл коня проти ДТ, а виявлення антигену проводили за допомогою біотинільованих $F(ab')_2$ -фрагментів антитіл коня проти ДТ та кон'югату стрептавідину з полімерною пероксидазою хрому. У другому варіанті (лігандрецепторний ІЕА) як антитіла першого порядку застосовували рекомбінантний sHB-EGF. Антиген виявлення так само, як і в першому випадку.

Отримані результати продемонстрували близьку граничну чутливість двох методів виявлення антигену (рис. 7).

Гепаринзв'язувальна ділянка у складі sHB-EGF розміщена у безпосередній близькості до EGF-подібного домену, який відповідає за зв'язування з рецепторами HER-1 і HER-4 та із субодиницею В ДТ. У третинній структурі EGF-подібного домену виділяють три петлі: А, В та С, кожна з яких стабілізована відповідним дисульфідним зв'язком. Петля А розміщена безпосередньо після гепаринзв'язувального домену та складається з позитивно заряджених амінокислот, як і сам цей домен. Імовірно, що просторове

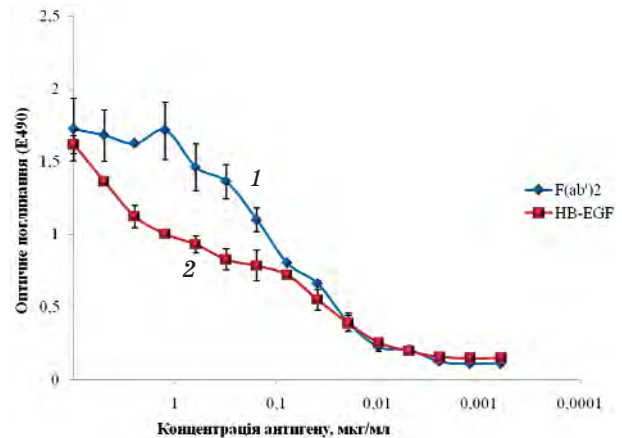


Рис. 7. Криві порівняльного визначення рекомбінантної субодиниці В ДТ у класичному «сандвіч»-ІЕА з використанням $F(ab')_2$ -фрагментів антитоксичних антитіл коня, сорбованих на планшеті (1) і в лігандрецепторному ІЕА з використанням рекомбінантного sHB-EGF, сорбованого на планшеті (2)

зближення позитивно заряджених залишків гепаринзв'язувальної ділянки та петлі А призводить до їх взаємного відштовхування, що, у свою чергу, впливає на конформацію EGF-подібного домену загалом. Оскільки за зв'язування з ДТ відповідають петлі А та С, зміна просторового розміщення петлі А під впливом гепаринзв'язувальної ділянки спричинює зниження афінності взаємодії рецепторзв'язувальної субодиниці ДТ з HB-EGF. Водночас, нейтралізація позитивного заряду гепаринзв'язувальної ділянки після взаємодії з гепарином призводить до підвищення рухливості петлі А, що сприяє збільшенню афінності взаємодії всієї молекули HB-EGF з ДТ та її природними рецепторами HER-1 і 4 [30]. Тому нами також було визначено константу афінності взаємодії рекомбінантного sHB-EGF людини з ДТ за присутності гепарину, яка становила $2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ (значення константи дисоціації K_d $5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$). З'ясовано, що збільшення спорідненості sHB-EGF людини до ДТ за присутності гепарину досить незначне: K_a без гепарину = $1,67 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ проти K_a з гепарином = $2,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$. Отже, виходячи з отриманих даних, внесення гепарину може неістотно підвищувати ефективність виявлення ДТ (або його субодиниці В) у лігандрецепторному ІЕА. З огляду на це було проведено порівняльне дослідження ефективності виявлення субодиниці В ДТ у лігандрецепторному ІЕА за двома схемами — з використанням рекомбінантного sHB-EGF, сорбованого безпосередньо на планшеті, і рекомбінантного sHB-EGF, що взаємодіє з гепарином, сорбованим на планшеті

(рис. 8). Як випливає з рис. 8, використання гепарину як нижнього шару дозволило дещо підвищити величину сигналу в ІЕА, що суттєво не вплинуло на чутливість аналізу.

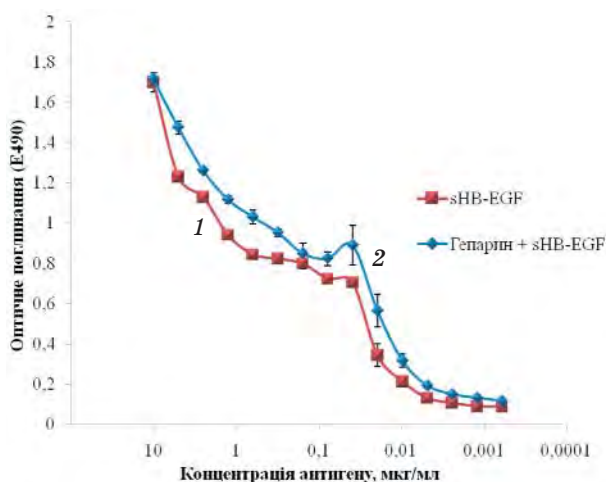


Рис. 8. Калібрувальні криві для порівняльного визначення рекомбінантної субодиниці В ДТ у лігандрецепторному ІЕА з використанням рекомбінантного sHB-EGF, сорбованого безпосередньо на планшет (1), і рекомбінантного sHB-EGF, що взаємодіє з гепарином, сорбованим на планшеті (2)

Дослідження інших властивостей отриманого sHB-EGF людини. Згідно з нашими попередніми даними, була встановлена здатність отриманого sHB-EGF на 30% стимулювати ріст і проліферацію клітин лінії ЗТЗ *in vitro*, що відкриває нові перспективи для застосування одержаного нами рекомбінантного протеїну не тільки як компонента тест-систем, але й як потенційного регулятора клітинних функцій.

Крім того, було показано, що імунізація мишей лінії Balb/c отриманим рекомбінантним аналогом sHB-EGF людини з використанням повного і неповного ад'юванту Фрейнда [31] здатна викликати у них потужну імунну відповідь (рис. 9). Тому специфічні гіперімунні сироватки мишей, імовірно, можна використовувати як блокатори біологічної дії sHB-EGF в експериментальних дослідженнях.

ЛІТЕРАТУРА

1. Higashiyama S., Abraham J. A., Miller J. et al. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF // Science. — 1991. — V. 251, N 22. — P. 936–939.
2. Naglich J. G., Metherall J. E., Russel D. W., Eidels L. Expression cloning of a diphtheria

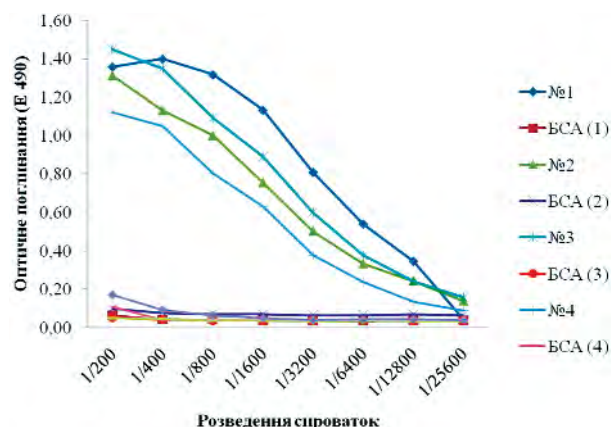


Рис. 9. Рівень гуморальної імунної відповіді до рекомбінантного sHB-EGF людини та контрольного антигену (сироваткового альбуміну бика — BSA) у 4 мишей Balb/c, імунізованих sHB-EGF

Таким чином, у результаті проведеної роботи було отримано та охарактеризовано рекомбінантний аналог секреторної форми гепаринзв'язувального фактору росту людини, подібного до епідермального фактору росту (sHB-EGF), оптимізовано умови його експресії та виділення, визначено константу афінності взаємодії з нативним ДТ, яка становила $1,67-2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$. Також показана здатність одержаного фактору взаємодіяти з гепарином та стимулювати проліферацію клітин *in vitro*. На нашу думку, отриманий рекомбінантний sHB-EGF може бути використано в подальших дослідженнях недостатньо вивчених етапів молекулярного механізму дії ДТ на клітини чутливих та нечутливих до нього видів ссавців, а також у дослідженнях, спрямованих на вивчення тонких молекулярних механізмів реалізації біологічних функцій розчинної форми HB-EGF стосовно клітин різного типу та їхньої ролі у процесах злочисної трансформації клітин. Проведені нами дослідження підтвердили також можливість використання рекомбінантного sHB-EGF під час створення імуноензимних тест-систем нового типу для виявлення ДТ, які дозволяли б виявляти лише функціонально-активні молекули токсину, здатні до рецепторопосередкованого проникнення в клітину.

- toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth precursor // Cell. — 1992. — V. 69, N 12. — P. 1051–1061.
3. Massague J., Pandiella A. Membrane-anchored growth factors // Annu. Rev. Biochem. — 1993. — V. 62. — P. 515–541.
4. Raab G., Higashiyama S., Hetelekidis S. et al. Biosynthesis and processing by phorbol ester

- of the cells surface-associated precursor form of heparinbinding EGF-like growth factor // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1994. — V. 204, N 28. — P. 592–597.
5. *Izumi Y., Hirata M., Hasuwa H. et al.* A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor // *EMBO J.* — 1998. — V. 17, N 15. — P. 7260–7272.
 6. *Weskamp G., Cai H., Brodie T. A. et al.* Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life // *Mol. Cell. Biol.* — 2002. — V. 22, N 5. — P. 1537–1544.
 7. *Asakura M., Kitakaze M., Takashima S. et al.* Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy // *Nat. Med.* — 2002. — V. 8, N 1. — P. 35–40.
 8. *Yan Y., Shirakabe K., Werb Z.* The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors // *J. Cell. Biol.* — 2002. — V. 158, N 2. — P. 221–226.
 9. *Iwamoto R., Handa K., Mekada E.* Contact-dependent growth inhibition and apoptosis of epidermal growth factor (EGF) receptor-expressing cells by the membrane-anchored form of heparin-binding EGF-like growth factor // *J. Biol. Chem.* — 1999. — V. 274, N 3. — P. 25906–25912.
 10. *Raab G., Klagsbrun M.* Heparin-binding EGF-like growth factor // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1997. — V. 1333. — P. F179–F199.
 11. *Higashiyama S., Abraham J. A., Klagsbrun M.* Heparin-binding EGF-like growth factor stimulation of smooth muscle cell migration: dependence on interactions with cell surface heparan sulfate // *J. Cell. Biol.* — 1993. — V. 122, N 4. — P. 933–940.
 12. *Piepkorn M., Pittelkow M. R., Cook P. W.* Autocrine regulation of keratinocytes: the emerging role of heparin-binding, epidermal growth factor-related growth factors // *J. Invest. Dermatol.* — 1998. — V. 111, N 5. — P. 715–721.
 13. *Abraham J. A., Damm D., Bajardi A. et al.* Heparin-binding EGF-like growth factor: characterization of rat and mouse cDNA clones, protein domain conservation across species, and transcript expression in tissues // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1993. — V. 190, N 15. — P. 125–133.
 14. *Downing M. T., Brigstok D. R., Luquette M. H. et al.* Immunohistochemical localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in normal skin and cancers // *Histochem. J.* — 1997. — V. 29, N 10. — P. 735–744.
 15. *Ito N., Kawata S., Tamura S. et al.* Heparin-binding EGF-like growth factor is potent mitogen for rat hepatocytes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1994. — V. 198, N 14. — P. 25–31.
 16. *Van Ness Jr., Howard J. B., Bodley J. W.* ADF ribosylation of elongation factor 2 by diphtheria toxin. Isolation and properties of the novel ribosyl-amino acid and its hydrolysis products // *J. Biol. Chem.* — 1980. — V. 255, N 25. — P. 10717–10720.
 17. *Lord J. M., Smith D. C., Roberts L. M.* Toxin entry: how bacterial proteins get into mammalian cells // *Cel. Microbiol.* — 1999. — V. 1, N 2. — P. 85–91.
 18. *Cha J.-H., Brooke J. S., Chang M. Y., Eidels L.* Receptor-based antidote for diphtheria // *J. Infect. Immun.* — 2002. — V. 70, N. 5. — P. 2344–2350.
 19. *Engler K. H.; Efstration A.* Rapid enzyme immunoassay for determination of toxigenicity among clinical isolates of corynebacteria // *J. Clin. Microbiol.* — 2000. — V. 38, N. 4. — P. 1385–1389.
 20. *Крамарев С. А., Литвиненко Н. Г., Буц А. Р. и др.* Значение обнаружения токсина в крови при дифтерийной инфекции у детей // *Лаб. диагн.* — 1998. — № 3. — С. 21–24.
 21. *Энглер К. Х., Норн Д., Козлов П. С. и др.* Быстрые фенотипические методы определения дифтерийного токсина у клинических штаммов коринебактерий // *Клин. микробиол. антимикр. тер.* — 2001. — Т. 3, № 2. — С. 156–162.
 22. *Engler K. H., Efstration A., Nom D. et al.* Immunochromographic strip test for rapid detection of diphtheria toxin: Description and multicenter evaluation in areas of low and high prevalence of diphtheria // *J. Clin. Microbiol.* — 2002. — V. 40, N 1. — P. 80–83.
 23. *Кабернюк А. А., Олійник О. С., Редчук Т. А. та ін.* Клонування генів рекомбінантних субодиниць ДТ *Corynebacterium diphtheriae* та їх експресія в клітинах *Escherichia coli* // *Доп. НАН України.* — 2008. — № 3. — С. 160–166.
 24. *Короткевич Н. В., Лабинцев А. Ю., Кабернюк А. А. та ін.* Цитотоксичність субодиниці В дифтерийного токсину щодо клітин гістоцитарної лімфоми людини U937 // *Укр. біохім. журн.* — 2009. — Т. 81, № 4. — С. 69–80.
 25. *Dower W. J., Miller J. F., Ragsdale C. W.* High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation // *Nucl. Acids Res.* — 1988. — V. 16, N 13. — P. 6127–6145.
 26. *Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.* Molecular cloning: A laboratory Manual, Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. — 1989. — P. A1.2 — A2.12.
 27. *Schägger H., von Jagow G.* Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa // *Anal. Biochem.* — 1987. — V. 166, N 2. — P. 368–379.

28. Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay // J. Immun. Meth. — 1985. — V. 77, N 2. — P. 305–319.
29. Higashiyama S., Lau K. E., Besner G. A. et al. Structure of heparin-binding EGF-like growth factor. Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein // J. Biol. Chem. — 1992. — V. 267, N 9. — P. 6205–6212.
30. Takazaki R., Shishido Y., Iwamoto R., Mekada E. Suppression of the biological activities of the epidermal growth factor (EGF)-like domain by the heparin-binding domain of heparin-binding EGF-like Growth Factor // J. Biol. Chem. — 1992. — V. 267, N 9. — P. 6205–6212.
31. Harlow E., Lane D. Antibodies: a laboratory manual. — N.-Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. — 726 p.

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО
АНАЛОГА СЕКРЕТОРНОЙ ФОРМЫ
НВ-EGF ЧЕЛОВЕКА И ОЦЕНКА
ПЕРСПЕКТИВ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
В БИОТЕХНОЛОГИИ**

*Н. В. Короткевич
Д. В. Колибо
А. Ю. Лабынцев
С. И. Романюк
С. В. Комисаренко*

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: gnr.nata@gmail.com

Получен рекомбинантный аналог секреторной формы гепаринсвязывающего фактора роста человека (sHB-EGF), подобный эпидермальному фактору роста, и исследована его функциональная активность, а также возможности создания на его основе тест-систем для выявления дифтерийного токсина (ДТ). Показана способность полученного sHB-EGF связываться с ДТ и гепарином, а также стимулировать *in vitro* пролиферацию клеток линии 3Т3, которые происходят из фибробластов мышей линии Balb/c. Константа аффинности взаимодействия рекомбинантного sHB-EGF с ДТ, рассчитанная по методу Фриге, составила $1,67 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, что соответствует константе аффинности для нативной формы рецептора. Рекомбинантный sHB-EGF был использован вместо первых антител в иммуноэнзимном «сэндвич»-анализе для выявления ДТ. Чувствительность разработанного метода составила 1,9 нг/мл. Полученный биотехнологический продукт может в перспективе найти применение как компонент тест-систем для диагностики дифтерии или лекарственных препаратов для стимулирования регенеративных процессов, а также как инструмент для проведения фундаментальных исследований.

Ключевые слова: гепаринсвязывающий фактор роста, подобный эпидермальному фактору роста человека, секреторная форма, рекомбинантный белок, тест-система, дифтерийный токсин.

**OBTAINING OF RECOMBINANT HUMAN
HEPARIN BINDING EGF-LIKE
GROWTH FACTOR AND PERSPECTIVES
OF ITS APPLICATION
IN BIOTECHNOLOGY**

*N. V. Korotkevich
D. V. Kolibo
A. J. Labyntsev
S. I. Romaniuk
S. V. Komisarenko*

Palladian Institute of Biochemistry of Ukrainian
National Academy of Sciences, Kyiv

E-mail: gnr.nata@gmail.com

In order to study functional activity and possibility of using in test-systems for diphtheria toxin (DT) detection the recombinant soluble form of human heparin binding EGF-like growth factor (sHB-EGF) was obtained. It was shown, that recombinant sHB-EGF could bind DT and heparin and also stimulate 3T3 mouse fibroblast's proliferation *in vitro*. Affinity constant for the interaction of recombinant sHB-EGF with DT estimated by Friquet method was $1.67 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ that was similar to the affinity of natural form of sHB-EGF. Recombinant sHB-EGF was used in the immunoenzyme «sandwich»-analyses instead capture antibodies for DT detection. Sensitivity of the developed method was 1.9 ng/ml. Obtained potential biotechnological product probably can be used as component of the test-systems for diphtheria diagnosis, as component of therapeutic drugs for stimulation of tissue regeneration or as a tool for fundamental researches.

Key words: human heparin binding EGF-like growth factor, soluble form, recombinant protein, test-system, diphtheria toxin.