

© Коллектив авторов, 2001
УДК 577.112: 616-006.6

Т. С. Боброва, Ю. В. Чуев, В. А. Морозов

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НЕКОТОРЫМИ КАРЦИНОМАМИ ЧЕЛОВЕКА

НИИ канцерогенеза

Ранее нами с помощью стандартных методических подходов были получены моноклональные антитела (МКА) 1F3-2D4 класса IgG к антигену(ам) перевиваемой клеточной линии Нер-2 (HeLa-подобная). С помощью этих антител методом иммуноблоттинга обнаружено семейство белков с мол. массой 30, 34, 36, 37—38, 70, 180 и 240 кД, главным из которых (по молекулярной массе и частоте обнаружения) является р38. Было исследовано 150 образцов лизатов опухолевых и нормальных тканей различной локализации. Интенсивная и умеренная реакция по р38 была обнаружена преимущественно у больных раком матки, почки и кишечника [1, 2].

Цель настоящей работы — дальнейшее исследование с помощью МКА методом иммуноблоттинга распределения семейства белков в лизатах нормальных и опухолевых тканей различной локализации, в сыворотках онкологических больных и возможностей их использования для дополнительной иммунодиагностики.

Материалы и методы. Образцы опухолевых тканей и тканей, взятых на расстоянии 5 см от опухоли, получены из отдела патологической анатомии, а сыворотки больных и здоровых доноров — из лаборатории биохимии НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. Клетки опухоли и нормальных тканей лизировали с использованием буфера, содержащего 100 ммоль/л NaCl, 0,1% SDS, 10 ммоль/л трис-HCl (pH 7,5), 1 ммоль/л ЭДТА, 0,5% тритон, 1 ммоль/л PMSF, 0,02% азида натрия. Лизат центрифугировали при 10 000 г в течение 10 мин.

Асциты получены с помощью введения гибридомных клеток мышам BALB/c, предварительно обработанных пристаном. Асцитическую жидкость осветляли центрифугированием при 10 000 г в течение 10 мин, добавляли 45% сульфата аммония и центрифугировали в том же режиме с дальнейшим диализом в PBS. Иммуноглобулиновую фракцию, выделенную из асцита, очищали с помощью ионнообменной хроматографии. В дальнейшей работе ее использовали для иммуноблоттинга [3].

Электрофорез и иммуноблоттинг. Для проведения иммуноблоттинга 10—20 мкл лизата, содержащего 50—70 мкг белка и 5 мкл сыворотки крови из разведения 1:100 (белок в лизатах определяли по методу Лоури), обработанных 2β-меркаптоэтанолом, подвергали электрофорезу в 8% полиакриламидном геле по У. К. Лаemmli [8, 9]. Белки переносили на нитроцеллюлозный фильтр «Hybond-C-Extra» («Amersham», Великобритания) в электрическом поле напряжением 2 В/см в течение 20 ч. Фильтры с антигенами обрабатывали по общепринятой методике [17]. МКА использовали в разведении 1:2000. Выявление реакции МКА с антигенами и в лизатах тканей, и в сыворотках крови больных и здоровых доноров было проведено в соответствии с протоколом с помощью реактивов «Ангога-ТМ» (ICN, США) с последующей экспозицией фильтра на пленку ORWO.

Аминокислотное секвенирование белка. Была проведена предварительная частичная очистка белка р38. Для этого к образцам лизатов рака почки, желудка, тела матки и соответствующих прилежащих тканей было добавлено равное количество 50% сульфата аммония и образцы оставлены на 16 ч при 4°C. Затем они были отцентрифугированы при 14 000 г в течение 20 мин. Осадки растворяли в дистиллированной воде с последующим диализом против забуференного физиологического раствора (PBS). Образцы были разогнаны в 8% полупрепаративном электрофорезе, зона, соответствующая по маркерам р38, была вырезана. Для элюции белков полоски геля были размельчены и обработаны буфером для нанесения образцов с 4% раствором

T.S.Bobrova, Yu.V.Chuyev, V.A.Morozov

IMMUNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROFILES OF A PROTEIN FAMILY ASSOCIATED WITH SOME HUMAN CARCINOMAS

Institute of Carcinogenesis

Previously we produced monoclonal antibody (MAb) IF3-2D4 of IgG class to antigen(s) of the transplantable cell line Hep-2 (HeLa-like) using standards methods. A family of proteins with molecular weights 30, 34, 36, 37-38, 70, 180 and 240 kilodalton was discovered by immunoblotting with these MAb. Protein p38 was of most importance by molecular weight and frequency. We studied 150 lysates of neoplastic and normal tissues from various sites. Intensive and moderate reactivity for p38 was detected mainly in patients with cancers of the womb, kidney and intestines [1,2].

The purpose of this investigation was to study in a greater detail distribution of the protein family in lysates of normal and tumor tissues from different sites and in sera of cancer patients by immunoblotting with the MAb, as well as prospects to use the MAb for immunodiagnosis.

Materials and Methods. Specimens of tumor tissues and normal tissues taken at 5 cm from tumors were supplied by the Pathoanatomy Department, sera from cancer patients and normal donors were received from the Biochemistry Laboratory, N.N.Blokhin Memorial CRC, RAMS. Tumor and normal tissue cells were lysed using buffer containing 100 mmol/l NaCl, 0.1% SDS, 10 mmol/l tris-HCl (pH 7.5), 1 mmol EDTA, 0.5% triton, 1 mmol/l PMSF, 0.02% sodium azide. The lysate was centrifuged at 10,000 g for 10 min. Ascites was induced by transplanting hybridoma cells to BALB/c mice previously treated with pristane. Ascitic fluid was cleared by centrifugation at 10,000 g for 10 min. Then 45% ammonium sulfate was added and the fluid was centrifuged in the same mode to undergo further dialysis with PBS. Immunoglobulin fraction extracted from the ascites was purified by ion exchange chromatography to be further used in immunoblotting [3].

Electrophoresis and immunoblotting. To perform immunoblotting 10-20 mcl lysate containing 50-70 mcg protein and 5 mcl blood serum of 1:100 dilution (lysate protein was measured by Lowry's technique) treated with 2β-mercaptopyrine were exposed to electrophoresis in 8% polyacryl gel after U.K.Laemmli [8,9]. The proteins were transferred onto nitrocellulose filter Hybond-C-Extra (Amersham, United Kingdom) in electric field 2 V/cm for 20 h. The filters with antigens were processed by standard technique [17]. The MAb was used in 1:2,000 dilution. Reactivity of MAb with the antigens in tissue lysates and in sera from normal donors and cancer patients was detected using Aurora-TM reagents (ICN, USA) with filter exposure onto an ORWO film to follow.

Protein amino acid sequencing. Preliminary partial purification of p38 was carried out. Equal portions of 50% ammonium sulfate were added to lysates of renal, gastric and uterine carcinomas and respective adjacent tissues and the specimens were left to stay for 16 h at 4°C to be further centrifuged at 14,000 for 20 min. The precipitates were dissolved in distilled water and underwent dialysis against phosphate-buffered saline (PBS). The specimens were exposed to 8% polyacryl gel semipreparatory electrophoresis, the area corresponding to p38 was cut out. To carry out protein elution gel strips were minced and treated with buffer to transfer the specimens with 4% β-mercaptopyrine solution for 30 min, boiled for 3 min and centrifuged at 12,000 g for 10 min. Then electrophoresis was carried out in 12% polyacrylamide gel in SDS-Tricine buffer (ICN, USA). The proteins were transferred onto a PVDF membrane (Bio-Red, USA) in 10 mmol/l CAPS (3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid) buffer (ICN, USA) with

β-меркаптоэтанола в течение 30 мин с последующим кипячением в течение 3 мин и центрифугированием при 12 000 g в течение 10 мин. Далее был проведен электрофорез в 12% полиакриламидном геле в SDS-Tricine-буфере (ICN, США). Белки были перенесены на PVDF-мембрану («Bio-Red», США) в 10 ммоль/л CAPS (3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid) буфере (ICN, США) с 10% метанолом при напряжении тока 25 В в течение 16 ч. Далее обработка мембраны проводилась по методике, описанной ранее [10]. Интересующие нас белки были вырезаны из мембраны. N-концевое секвенирование белков было проведено на Applied Biosystems Model 477A Pulsed-Liquid Sequencer.

Результаты и обсуждение. С помощью МКА 1F3-2D4 (класс IgG), полученных к белку(ам) перевиваемой клеточной линии Нер-2 (рак гортани, HeLa-подобная) методом иммуноблоттинга по методике «Ауугоа» (ICN, США), в 305 образцах лизатов опухолевых и нормальных тканей различной локализации обнаружено семейство белков с мол. массой 28—30, 33, 36, 37—38, 50—53—55, 65, 70—73, 150 и 240 кД, главным из которых по интенсивности выявления и частоте обнаружения является р38 (см. таблицу и рисунок). Интенсивная и умеренная реакция по р38 была обнаружена: в 5 (83%) из 6 случаев опухолей яичника (в основном это цистаденокарцинома III стадии); в 6 (55%) из 12 — рака почек (преимущественно светлоклеточный почечно-клеточный рак II стадии); в 40% (3 из 8, 3 из 7, 4 из 10, 6 из 15 соответственно) случаев у больных раком шейки матки, легкого, кожи и костей, кишечника; в 33% (11 из 33, 6 из 18 соответственно) случаев у больных раком молочной железы — РМЖ (преимущественно в инфильтративно-протоковом раке) и желудка (чаще у больных с низкодифференцированной формой аденокарциномы преимущественно III стадии); в 10 (33%) из 31 образца лизатов метастазов, преимущественно у больных РМЖ; причем в 3 случаях в опухоли р38 при этом не обнаружен. Очень интенсивная реакция отмечена в 2 из 3 случаев метастаза меланомы. р38 не обнаружен ни в норме, ни в образце опухоли печени и паразитарной кисте в печени, но выявлен в 6 из 7 образцов метастазов опухолей кишечника в печень, при том что в 1 опухоли при этом не обнаружен у больного с IV стадией. Белок не обнаружен в метастазе опухоли головки поджелудочной железы и в метастазе эмбрионального рака. Интенсивная реакция выявлена также в 1 образце плаценты. Слабая экспрессия р38 обнаружена лишь в 12% образцов лизатов нормальных тканей. Было обнаружено повышенное, редко встречаемое одновременное присутствие белка р38 и р150, р65 кД (в 9 из 385), в основном у больных РМЖ (у 6 из 9), меланомой, раком почки и кишечника; р38 и р36, р70 (у 7 из 385 и у 5 из 385 соответственно) при раке легкого, раке тела и шейки матки и в ткани метастазов при раке шейки матки. В 3 из 6 случаев р36 обнаружен у больных с заболеваниями мозга (постинсультная киста), р38 при этом был слабовыражен или отсутствовал. Представляется вероятным, что р36 является изоформой белка р38 (см. таблицу и рисунок).

Вторым по частоте обнаружения является двойной белок с мол. массой 53—55 кД, который стал чаще выявляться в лизатах тканей после изменения режима переноса белков на нитроцеллюлозу (увеличение силы тока на 2 см блота и времени). Умеренная и интенсивная реакции по р53—55 выявляются и в нормальной, и в опухолевых тканях. В прилежащих тканях интенсивность реакции часто превосходила таковую в опухоли. Наиболее часто р53—55 был обнаружен в лизатах больных РМЖ и с опухолями мочеполовой системы, а также в прилежащих к ним тканях. Белок р50—53 выявлен лишь в двух случаях

10% methanol under 25 V for 16 h. Further membrane processing was performed by technique described elsewhere [10]. The proteins of interest were cut out from the membrane. Protein N-terminal sequencing was performed using an Applied Biosystems Model 477A Pulsed-Liquid Sequencer.

Results and Discussion. A family of proteins with molecular weights 28-30, 33, 36, 37-38, 50-53-55, 65, 70-73, 150 and 240 kilodalton, the p38 being of most significance by intensity and frequency (see the table and the figure) was discovered by immunoblotting as performed according to Aurora (ICN, USA) methodology using MAb 1F3-2D4 (IgG) to protein(s) of transplantable cell line Hep-2 (laryngeal carcinoma, HeLa-like) in 305 lysates of tumor and normal tissues from different sites. Intensive and moderate p38 reactivity was found in 5 (83%) of 6 ovarian carcinomas (mainly stage III cystadenocarcinomas), 6 (55%) of 12 renal carcinomas (mainly stage II clear-cell hepatocellular carcinoma), 40% (3/8, 3/7, 4/10, 6/15, respectively) of carcinomas of the cervix, lung, skin and bone, intestines, 33% (11/33, 6/18, respectively) of breast carcinoma (mainly infiltrative ductal carcinoma) and gastric carcinoma (mainly stage III poorly differentiated adenocarcinoma), 10 (33%) of 31 lysates of metastases mainly from breast cancer patients; 3 tumors did not contain p38. Of much interest was reactivity in 2 of 3 melanoma metastasis cases. The p38 was not found either in normal tissue or in liver tumors and parasitic hepatic cysts, but was present in 6 of 7 liver metastases of intestinal tumors, with 1 of the tumors being from a cancer patient with stage IV disease. The protein was not found in metastasis of tumor of the head of the pancreas and in metastasis of embryonic carcinoma. Intense reactivity was found in 1 placenta specimen. Weak p38 expression was discovered only in 12% of lysates of normal tissues. Of interest was the discovery of simultaneous presence of p38 and p150, p65 (9/385) in patients with breast cancer (6/9), melanoma, renal carcinoma and intestinal carcinoma; p38 and p36, p70 (7/385 and 5/385, respectively) in lung, endometrial and cervical carcinomas, metastases of cervical carcinoma. p36 was found in 3 of 6 cases with brain lesions (postinsult cyst), p38 being found in small amounts or absent. It seems that p 36 is an isoform of p38 (see the table and the figure).

The second most frequent finding was a double protein with molecular weight 53-55 kilodalton which was encountered more frequently after the mode of protein transfer onto nitrocellulose was changed (time and current increase at 2 cm blot). Moderate or intense reactivity for p53-55 was found both in normal and neoplastic tissues. The reactivity in adjacent tissues was often more marked as compared to tumors. The p53-55 was found most frequently in lysates from patients with breast cancer and urogenital tumors as well as from tissues adjacent to these tumors. Protein 50-53 was discovered only in two cases with gastric cancer (undifferentiated carcinoma with preponderance of signet-ring cell elements) and in 1 lysate of renal carcinoma.

Nature of the discovered proteins is unknown. By interim findings, the marked expression of p38 in lysates of tissues from patients with gastric, breast, endometrial, cervical, renal and intestinal carcinoma in combination with expression of other proteins such as p28, p33, p36, p65, p70, p150, p180 and p240, may have prognostic significance as indicative of early metastasis. The MAb may recognize a common immunodominant carbohydrate-associated epitope.

Таблица

Table

Выявление белка p38 в лизатах образцов опухолевых и прилежащих тканей с помощью МКА 1F3-2D4

Detection of p38 in lysates of tumor and adjacent tissues with MAb 1F3-2D4.

Опухоли	Количество образцов опухолевых тканей (положительные/общее количество)	%*	Количество образцов прилежащих тканей (положительные/общее количество)	%*
Рак желудка / Gastric carcinoma	6/18 ++, +++	33	2/14 ++, +++	14
Аденокарцинома низкодифференцированная Poorly differentiated adenocarcinoma	5/18 ++, +++	27	1/4 ++	25
Рак кишечника / Intestinal carcinoma	6/15 ++, +++	40	2/6 ++	33
Аденокарцинома умеренно- дифференцированная Moderately differentiated adenocarcinoma	6/15 ++, +++	40	2/5 ++	40
Рак печени / Hepatic carcinoma	0/1 -	0	0/1 -	0
Метастазы рака кишечника в печень Liver metastases of intestinal carcinoma	6/7 ++, +++	85	1/7 +++	14
Паразитарная киста печени Parasitic hepatic cyst	0/1 -	0		
Рак молочной железы Breast carcinoma	11/33 ++, +++	32	1/21 ++, 3/21 +	19
Инфильтративный протоковый рак Infiltrative ductal carcinoma	9/33 ++, +++	22		
Метастазы в лимфоузлы Lymph node metastases	10/21 ++, +++	47		
Доброкачественные заболевания молочной железы Benign lesions of the breast	1/4 +	25		
Рак тела матки / Endometrial carcinoma	4/13 ++++	30	2/8 ++	28
Рак шейки матки / Cervical carcinoma	3/8 ++++	38	2/4 ++	50
Метастазы / Metastases	1/1 ++++			
Рак яичника / Ovarian carcinoma	6/7 ++, +++	83	2/3 +	66
Метастазы / Metastases	1/1 +++			
Рак яичка / Testicular carcinoma	4/5 ++	55	Не исследовались Not investigated	
Рак почки / Renal carcinoma	6/12 +++	50	4/10 ++	40
Метастазы / Metastases	1/1 ++			
Рак легкого / Lung carcinoma	3/7 ++, ++++	43	2/3 +	66
Tumors	No. of tumor tissue specimens (positive/total)	%*	No. of adjacent tissue specimens (positive/total)	%*

Опухоли	Количество образцов опухолевых тканей (положительные/общее количество)	%*	Количество образцов прилежащих тканей (положительные/общее количество)	%*
Плоскоклеточный ороговевающий рак Squamous-cell keratinizing carcinoma	3/6 ++++	50		
Злокачественные заболевания кожи Malignant cutaneous lesions	2/4 +++	50	2/5 +	40
Метастазы / Metastases	2/3 ++++	67	0/2	0
Доброкачественные заболевания кожи Benign cutaneous lesions	2/5 ++	40		
Рак щитовидной железы Thyroid carcinoma	1/6 +++	17	0/3	0
Метастазы / Metastases	0/1	0		
Доброкачественные заболевания щитовидной железы Benign thyroid lesions	3/6 +	50	0/1	0
Другие локализации (опухоли гортани, пищевода и др.) Other sites (larynx, esophagus, etc.)	3/4 ++, +++	75	2/2 +	100
Заболевания мозга (постинсультная киста, кровоизлияние, гематома) Brain lesions (postinsult cyst, hemorrhage, hematoma)	3/6 +	50	Не исследовались	
Эмбриональные ткани Embryo tissues	6/10 + 1/10 ++	60 10	Не исследовались	
Плацента / Placenta	1/1 ++++	100		
Итого... / Total...	104/206 ++, +++	50	11/90 + 14/90 ++	12 15
Tumors	No. of tumor tissue specimens (positive/total)	%*	No. of adjacent tissue specimens (positive/total)	%*

Примечание. %* — процент положительных реакций; ++++ — очень сильная реакция; +++ — сильная реакция; ++ — умеренная реакция; + — слабая реакция; - — отсутствие реакции.
Note. %*, percentage of positive reactivity; ++++, very strong reactivity; +++, strong reactivity; ++, moderate reactivity; +, weak reactivity; -, no reactivity.

рака желудка (недифференцированный рак с преобладанием перстневидно-клеточных элементов) и в 1 образце лизата рака почки.

Природа обнаруженного семейства белков неизвестна. По предварительным данным, выраженная экспрессия белка p38 в лизатах тканей больных раком желудка, молочной железы, тела и шейки матки, почки и кишечника, сочетающаяся с экспрессией других белков — p28, p33, p36, p65, p70, p150, p180 и p240 — может иметь прогностическое значение, указывая на возможность раннего метастазирования. МКА, возможно, выявляют общий иммунодоминантный карбогидратассоциированный эпитоп.

С целью выявления p38 и/или других белков было исследовано МКА методом иммуноблоттинга с помощью реактивов и методики «Аурога» (ICN, США) 48 сывороток больных с различной локализацией опухоли и 4 сыворотки здоровых доноров. p38 при общей концентрации белка 3 мкг на блоте обнаружен не был.

Detection of p38 and/or other proteins was carried out by MAb immunoblotting in 48 sera from patients with different tumor sites and 4 sera from normal donors using Aurora (ICN, USA) reagents and procedures. At a total protein concentration 3 mcg no p38 was found. While different degree of positive reactivity for p50-53 was discovered at the same protein concentration in all sera (16) from breast cancer patients including 12 (75%) with moderate and 4 (25%) with weak reactivity seemingly related to chemotherapy. This finding confirms results of our previous study of sera from breast cancer patients using immune serum to 3MKC1 extract of Hep-2 cells (laryngeal carcinoma, HeLa-like) when 11 of 11 sera from breast cancer patients demonstrated intensive reactivity as discovered by dotblotting [1], and in the next study when a protein with molecular weight 56-60 kilodalton was discovered by immunoblotting that in our opinion was

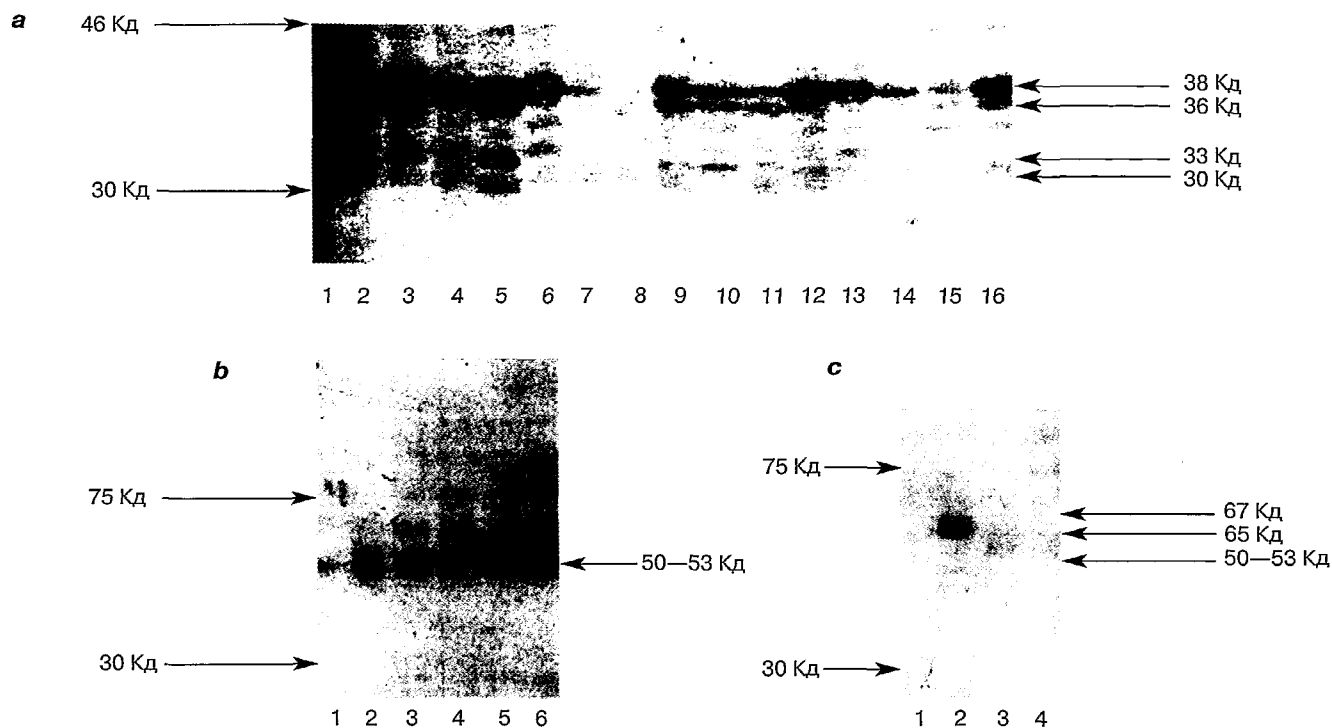


Рисунок. Выявление белков в лизатах тканей и сыворотках онкологических больных с помощью МКА 1F3-2D4 методом иммуноблоттинга.

a: — лизаты: 1, 2 — опухоль яичника и метастаз опухоли яичника соответственно; 3 — рак почки; 4 — фолликулярный рак щитовидной железы; 5 — постинсультная киста мозга; 6 — плацента; 7, 8 — лизаты рака шейки матки; 9, 10 — лизаты рака тела матки; 11, 12 — нормальный желудок и рак желудка соответственно; 13 — рак молочной железы; 14, 15, 16 — метастаз, прилежащая к опухоли ткань и опухоль соответственно;

b: 1–6 — сыворотки крови пациенток РМЖ;

c: сыворотки: 1, 4 — здорового донора; 2 — пациента раком печени; 3 — пациента с лимфопролиферативным заболеванием. Справа стрелками указаны выявляемые белки; слева — мол. масса, кД.

Figure. Protein detection in tissue lysates and sera from cancer patients by MAb 1F3-2D4 immunoblotting.

a, lysates: 1, 2, ovarian tumor and metastasis of ovarian tumor, respectively; 3, renal carcinoma; 4, follicular thyroid carcinoma; 5, postinsult brain cyst; 6, placenta; 7, 8, cervical carcinoma; 9, 10, endometrial carcinoma; 11, 12, normal stomach and gastric cancer, respectively; 13, breast carcinoma; 14, 15, 16, metastasis, tissue adjacent to the tumor and the tumor, respectively;

b: 1-6, sera from breast cancer patients;

c, sera: 1, 4, normal donors; 2, hepatic carcinoma patient; 3, patient with lymphoproliferative disease.

Right: arrows specify proteins in question; left: molecular weight, kilodalton.

Однако при той же концентрации белка отмечена положительная реакция по белку р50—53 разной степени интенсивности во всех образцах сывороток (16) больных РМЖ; при этом умеренная и интенсивная реакции отмечены в 12 (75%) из 16 случаев, а слабая — в 4 (25%) из 16, которая, возможно, связана с проводимой химиолучевой терапией. Это подтверждает данные наших предыдущих исследований сывороток больных РМЖ с помощью иммунной сыворотки, полученной к 3М КС1 экстракту клеток Нер-2 (рак гортани, HeLa-подобная), когда в 11 из 11 образцов сывороток крови больных РМЖ методом дотблоттинга была выявлена интенсивная реакция [1], а в последующей работе методом иммуноблоттинга был определен белок с мол. массой 56—60 кД, ответственный, по нашему мнению, за интенсивную реакцию [4]. Кроме этого, выявляется повышенная экспрессия р53—55 (преимущественно р53) в образце сыворотки крови у больного раком легкого; у него же слабо выявляются и другие белки с мол. массой 43, 65, 73 кД. Слабая реакция по белку р50—51 обнаружена в 2 из 8 образцов сыворотки крови больных лимфопролиферативными заболеваниями. Выявлена также интенсивная реакция по белку р65—67 (преимущественно с мол. массой 67 кД) в 1 из 2 образцов сыворотки крови больного раком

ответственный за интенсивную реакцию [4]. Besides, an increased expression of p53—55 (mainly p53) was detected in 1 serum from a lung cancer patient as well as weak reactivity for other proteins with molecular weights 43, 65, 73 kilodalton. Weak expression of p50—51 was discovered in 2 of 8 sera from patients with lymphoproliferative diseases. Intensive reactivity for p65—67 (mainly p67) was found in 1 of 2 sera from a patient with hepatic carcinoma. There were no proteins with molecular weights 50—53—55, 65—67 kilodalton in sera from normal donors.

Interim N-terminal amino acid sequencing of proteins was performed. In spite of the fact that we failed to achieve complete homogeneity of protein specimens, the interim findings demonstrated p38 to be similar to T-lymphocyte receptor β -chain. We plan to continue the protein study, in particular with proteolytic enzymes and amino acid sequencing of proteolysis product internal fragments to follow.

The discovered antigens are similar to carcinoembryonic antigens (CEA) by molecular weight and location. The CEA family belongs to an immunoglobulin superfamily including the CEA itself (molecular weight 180–200 kilodalton), biliary glycoprotein, BGP (molecular weight 110–85 kilodalton), relative antigens,

печени. В сыворотках здоровых доноров белки с мол. массой 50—53—55, 65—67 кД не обнаружены.

Получены предварительные результаты N-концевого аминокислотного секвенирования белков. Несмотря на то что нам не удалось добиться полной гомогенности белковых препаратов, тем не менее предварительные данные свидетельствуют о том, что р38 имеет сходство с β -цепью Т-клеточного рецептора. Предполагается провести дальнейшее исследование белков, в частности с помощью протеолитических ферментов с последующим аминокислотным секвенированием внутренних фрагментов продуктов протеолиза.

По молекулярной массе и локализации выявляемые антигены похожи на представителей семейства раково-эмбриональных антигенов (РЭА). Семейство РЭА=СЕА относится к суперсемейству иммуноглобулинов и включает в себя собственно РЭА (мол. масса 180—200 кД), билиарный гликопротеин — BGP (мол. масса 110—85 кД), родственные антигены — неспецифические перекрестно-реагирующие антигены (nonspecific cross-reacting antigens, NCA). СЕА и NCA экспрессируются только у приматов, в то время как BGP и у приматов, и у грызунов. NCA — это высокогликозилированные бактериосвязывающие рецепторы, обнаруженные на человеческих гранулоцитах и в клетках других тканей. В нейтрофилах NCA с мол. массой 160, 100, 95, 90 и 26 кД выявлены в азурофильных и специфических гранулах. Предполагается, что NCA с мол. массой 26 кД, выявленный в специфических гранулах нейтрофилов совместно с NCA с мол. массой 160 кД и BGP, является вариантом сплайсинга NCA с мол. массой 160 кД. Имеются данные о том, что NCA160 обладает свойствами лектина, способного индуцировать у нейтрофилов гиперпродукцию анионов О-2, убивающих микробы и приобретающих важную роль в процессах воспаления и защиты организма благодаря модулирующей функции нейтрофилов [5]. В качестве неизвестных членов семейства РЭА предполагают NCA80, 58, 30 [7]. Кроме того, на 5-м рабочем совещании по лейкоцитарному типированию группа NCA внесена в кластеры антигенов дифференцировки лейкоцитов-CD66a-d [11]. Экспрессия NCA-50/90=CD66c повышена при раке кишечника. CD66c экспрессируется также в тканях нормального легкого и селезенки и, кроме того, на гранулоцитах. NCA-95=CD66b является единственным гранулоцитарно-специфическим антигеном, обнаруживающимся в сыворотке крови онкологических больных. Он может представлять интерес как маркер карциномы почек и тела матки, для которых удовлетворительных маркеров пока не обнаружено. Обнаружены и изучены нормальный антиген фекалий (normal faecal antigen-2, NFA-2) и NCA-2, выявленные в нормальных человеческих фекалиях и меконии соответственно. К ним получены МКА, перекрестнореагирующие с РЭА. Эти антигены являются нормальной составной частью РЭА, продуцируемого эпителиальными клетками кишечника взрослого и плода. Однако родственные антигены семейства гена человеческого РЭА имеют радикальные отличия. При исследовании межклеточных взаимодействий *in vitro* показано, что BGP, являясь трансмембранной молекулой в процессах межклеточного взаимодействия, зависит от температуры и наличия ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} и не угнетается АТФ, в то время как межклеточное взаимодействие, обусловленное СЕА и NCA, не является температуро- и ионозависимым. Помимо этого, присущая СЕА эктопическая экспрессия в миоблестах свойственна также и NCA, но не BGP

non-specific cross-reacting antigens (NCA). The CEA and NCA are expressed in primates only, while the BGP is found both in primates and rodents. The NCA is highly glycosylated bacteria-binding receptor found on human granulocytes and on other tissue cells. NCA with molecular weights 160, 100, 95, 90 and 26 kilodalton are found in azurophilic and specific granules in neutrophils. The NCA with molecular weight 26 kilodalton, found in neutrophil specific granules together with the NCA having molecular weight 160 kilodalton and BGP, is supposedly a variant of splicing of an NCA with molecular weight 160 kilodalton. There are data demonstrating that the NCA160 demonstrates the lectin ability to induce in neutrophils hyperproduction of O-2 anions that kill microbes and play an important role in inflammation processes and protection of the body owing to neutrophils' modulating function [5]. Other known antigens supposedly belonging to the CEA family are NCA80, 58, 30 [7]. The NCA group was included into CD66a-d leukocyte differentiation antigen clusters at the 5th workshop on leukocyte typing [11]. NCA-50/90=CD66c expression is increased in intestinal carcinoma. CD66c is expressed in tissues of normal lung and spleen and also on granulocytes. NCA-95=CD66b is the only granulocyte-specific antigen found in sera from cancer patients. It may be of interest as a marker of renal and endometrial carcinomas which do not have satisfactory markers yet. We detected and studied normal fecal antigen-2 (NFA-2) and NCA-2 as found in normal human feces and meconium, respectively. MAb cross-reacting to CEA was produced to these antigens. These antigens are a normal component of CEA produced by adult and fetus intestinal epithelial cells. However, relative antigens of human CEA family have radical differences. As demonstrated *in vitro*, BGP as a transmembrane molecule contributing to intercellular interactions, depends upon temperature and the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions and is not inhibited by ATP, while the intercellular interactions mediated by CEA and NCA are not temperature- or ion-dependent. Besides, the CEA-specific ectopic expression in myoblasts is also characteristic of NCA, but not of BGP [12,13,15,16]. HAA1 is not an NCA-2 antigen since it is not found in meconium. The HAA1 is not BGP either because it is not found in hepatic tumors or normal liver tissue, though it may be either CEA (or its fragment) or NCA since they have the same molecular weight and location, and besides, demonstrate positive MAb reactivity with myosin from rabbit muscle and with cattle erythrocyte carboanhydrase, a common marker of molecular weight.

It is also possible, however, that MAb 1F3-2D4 recognizes in some cancer patient sera and tumor lysates a certain epitope that is immunologically common for, e.g. src-family of protein tyrosine kinases (PTKs) with molecular weight 53-56, 59 kilodalton and related complexes. The Src and Fyn PTK families make a large contribution to many biological processes including gene transcription, tumor progression, cell adhesion and metastasis [6]. Some authors report of discovery of GPI-bound glycoproteins and glycolipids together with PTKs and probably their substrates in detergent-resistant complexes in human cell lines. It is supposed that these complexes form functional surface domains that play a key role in early stages of lymphocyte and mastocyte activation. Activation of mastocytes is also observed as a result of their binding with high-affinity

[12, 13, 15, 16]. HAA1 не является NCA-2-антигеном, поскольку не обнаружен в меконии. HAA1 не является, по-видимому, и BGP, так как не выявляется ни в опухоли, ни в нормальной ткани печени, но может быть либо СЕА (или его фрагментами), либо NCA, поскольку наряду со схожей молекулярной массой и локализацией в ряде случаев обнаружена положительная реакция МКА с миозином из мышцы кролика и с карбоангидразой эритроцитов крупного рогатого скота, часто используемой в качестве маркера молекулярной массы.

Однако мы не можем исключить и того, что МКА 1F3-2D4 выявляют в некоторых сыворотках онкологических больных и лизатах опухолевых тканей какой-то эпителии, иммунологически общих, например, для src-семейства протеинтирозинкиназ (PTKs) с мол. массой 53—56, 59 кД и связанных с ними комплексов. Семейства Src и Fyn PTKs занимают важное место во многих биологических процессах, включая транскрипцию гена, прогрессию опухоли, клеточную адгезию и метастазирование [6]. Некоторые авторы приводят данные о том, что в детергентустойчивых комплексах в человеческих клеточных линиях обнаружены GPI-связанные гликопротеины и гликолипиды совместно с PTKs и, возможно, их субстратами. Предполагается, что эти комплексы формируют функциональные поверхностные домены, играющие ключевую роль в ранних стадиях активации лейкоцитов и тучных клеток. Активация тучных клеток, по мнению авторов, наблюдаются также в случае связывания с ними высокоаффинного IgE-рецептора-Fce RI, когда фосфорилируются по тирозину разные белки. С src-семейством протеинтирозинкиназ может связываться также и DAF или CD55 (Decay-accelerating factor) — ускоряющий разложение белок с мол. массой 70 кД, соединенной с мембраной клетки гликофосфатидилинозитолом (GPI). DAF широко представлен на человеческих клетках [14]. Он предохраняет клетки от комплементобусловленного лизиса предупреждением формирования или диссоциацией C3-конвертаз. GPI-связанный DAF способен к передаче ранних проявлений активации, ведущих к тирозиновому фосфорилированию белка с мол. массой 40 кД и нескольких белков с мол. массой 85—95 кД. По мнению авторов, DAF с src-семейством протеинтирозинкиназ нуждается в GPI для передачи сигналов через белки, связанные с GPI. Повышенная экспрессия и активность семейства Src PTKs обнаружены в некоторых опухолях человека, включая и рак яичника [18]. Авторы пришли к выводу о том, что снижение активности PTKs угнетает рост опухоли яичника человека, воспроизведенной на модели nude-мышей.

Таким образом, нам представляется важным продолжить исследование распределения p38 и других белков в лизатах почки, яичника, кишечника, в сыворотках крови больных с этими и некоторыми другими локализациями опухоли, в образцах метастазов этих опухолей с целью выявления особенностей экспрессии данных белков для возможного последующего использования в качестве дополнительных методов иммунологической диагностики и/или мониторинга этих форм локализации опухоли.

IgE-receptor Fce R1 when tyrosine phosphorylation of different proteins occurs. DAF or CD55, a decay accelerating factor with molecular weight 70 kilodalton linked to cell membrane with glycoposphatidyl inositol (GPI), can also bind to the src protein tyrosine kinase family. The DAF is found in many human cells [14]. It protects cells from complement-dependent lysis by preventing formation or dissociation of C3 convertases. The GPI-bound DAF can mediate early activation events leading to tyrosine phosphorylation of a protein with molecular weight 40 kilodalton and several proteins with molecular weight 85-95 kilodalton. The authors think that DAF with src protein tyrosine kinase family need GPI to transmit signals via GPI-linked proteins. Increased expression of Src PTKs is found in some human tumors including ovarian carcinoma [18]. The authors made the conclusion that decline in PTK activity led to human ovarian carcinoma growth inhibition in nude mice.

In conclusion, we think very important to continue study of distribution of p38 and other proteins in lysates of kidney, ovary, intestines, in sera from patients with cancer of these and some other sites, in metastases of these tumors in order to know particulars of the protein expression to be further used as factors of supplementary immunological diagnosis and/or monitoring of these tumors.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Боброва Т. С. Антиген стабильных клеточных линий и слизистой оболочки желудка человека : Дис.... канд. мед. наук. — М., 1988.
2. Боброва Т. С., Чуев Ю. В., Морозов В. А. // Экспер. онкол. — 2000. — Т. 22, № 3. — С. 118—125.
3. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. — М., 1985. — С. 249—339.
4. Bobrova T. S., Kravkova I. N., Chuev Y. V., Rottenberg V. I. // Neoplasma. — 1991. — Vol. 38. — P. 313—322.
5. Grunert F., Daniel S., Nagel G. et al. // Int. J. Cancer. — 1995. — Vol. 63. — P. 349—355.
6. Hakak J., Martin G. S. // Curr. Biol. — 1999. — Vol. 9, N 18. — P. 1039—1042.
7. Kuroki M., Yamanaka T., Matsuo Y. et al. // Immunol. Invest. — 1995. — Vol. 24. — P. 829—843.
8. Laemmli U. K. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680.
9. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265.
10. Morozov V. A., Copeland T. D., Nagashima K. et al. // Virology. — 1997. — Vol. 228. — P. 307—317.
11. Nagel G., Grunert F. // Tumour Biol. — 1995. — Vol. 16. — P. 17—22.
12. Nollau P., Prall F., Helmchen U. et al. // Am. J. Pathol. — 1997. — Vol. 151. — P. 521—530.
13. Rojas M., DeMarte L., Screaton R. A., Stanners S. P. // Cell Growth Differ. — 1996. — Vol. 7. — P. 655—662.
14. Shenoy-Scaria A. M., Kwong J., Fujita T. et al. // J. Immunol. — 1992. — Vol. 49, N. 11. — P. 3535—3541.
15. Tanaka K., Hinoda Y., Taakahashi H. et al. // Int. J. Cancer. — 1997. — Vol. 74. — P. 15—19.
16. Thompson J., Seitz M., Chastre E. et al. // Cancer Res. — 1997. — Vol. 57. — P. 1776—1784.
17. Towbin H. T., Staehelen T., Gordon J. // Proc. natl. Acad. Sci. USA. — 1979. — Vol. 76. — P. 4350—4354.
18. Wiener J. R., Nakano K., Kruzerlock R. P. et al. // Clin. Cancer Res. — 1999. — Vol. 5, N 10. — P. 2164—2170.