

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Т. С. Боброва, Ю. В. Чуев, В. Е. Шевченко
**СЕМЕЙСТВО HeLa-АССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ:
 ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА**

НИИ канцерогенеза ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Цель исследования — изучение реакции организма человека на очищенный р34 из лизатов образцов рака шейки матки и нормальных тканей шейки матки. Использовали иммуноблоттинг, исследовали сыворотку больных и здоровых доноров. Антитела к р50—55, р65—69 (субъединицы очищенного р34) выявлены в сыворотке больных лимфопролиферативными заболеваниями, злокачественными опухолями желудочно-кишечного тракта и легкого. Антитела к р50—55 и р65—69 в разведении 1:100 обнаружены при раке молочной железы, желудка и пищевода, в разведении 1:200 — при остром лейкозе, у 2 из 6 больных раком гортани и у больного с метастазами рака толстой кишки в печени. У 3 из 20 больных соматическими заболеваниями и у 1 из 16 здоровых доноров выявлены антитела к р65—69 из лизата образцов рака шейки матки и отсутствие у тех же больных антител к белку с той же молекулярной массой из лизата нормальных тканей шейки матки. У 4 из 6 больных раком гортани не обнаружено различий в реакциях сывороток с р50—55 и р65—69, выделенных из опухолевых или нормальных тканей. Необходимы дальнейшие исследования с целью выяснения причин появления антител к р50—55 и р65—69 у онкологических больных и возможностей использования полученных данных для серологической диагностики.

Ключевые слова: опухолево-ассоциированные белки, иммуноблоттинг, вестерн-блоттинг, аутоантитела.

Ранее с помощью стандартных методических подходов нами получены моноклональные антитела IgG (МКА 1) к белкам перевиваемой клеточной линии НЕР-2 (рак гортани, HeLa-подобная). С помощью МКА 1 методом иммуноблоттинга обнаружено семейство белков с молекулярными массами 30—34—36, 37—38, 70, 180 и 240 кДа, из которых по интенсивности реакции и частоте обнаружения превалирует р34—38. Исследовано около 300 образцов лизатов опухолевых и нормальных тканей. Интенсивная и умеренная реакция на р34—38 обнаружена преимущественно у больных раком яичников, матки, почки и разных отделов кишечника [1; 2].

Литературные данные об аутоантителах у онкологических больных немногочисленны и противоречивы, поэтому цель настоящей работы — выявление антител к белкам HeLa-ассоциированного семейства в сыворотке онкологических больных, больных с соматическими заболеваниями и здоровых доноров, для чего использованы очищенные белки из лизатов образцов рака шейки матки (НЕР-2 — HeLa-подобная клеточная линия рака гортани, HeLa-клеточная линия получена из образцов РШМ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы опухолевых тканей и тканей, взятых на расстоянии 5 см от опухоли, получены из отдела патологической анатомии, сыворотка онкологических больных, соматических больных и здоровых доноров — из лаборатории биохимии НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.

Сыворотку больных и здоровых доноров осветляли центрифугированием при 200 g в течение 10 мин, разливали по 0,2 мл в пробирки и хранили при температуре – 20°C. Кроличья сыворотка (Ac 3) получена к экстракту клеток E16B (рак молочной железы, HeLa-подобная) (3M раствор KCl) [1]. Меченные пероксидазой антисыворотки к иммуноглобулинам человека и кролика получены из Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи.

Клетки опухолевых и нормальных тканей лизировали с использованием буфера, содержащего 100 ммоль/л NaCl, 0,1% додецилсульфата натрия (SDS), 10 ммоль/л трис-HCl (pH 7,5), 1 ммоль/л ЭДТА, 0,5% Triton X-100 («Sigma», США), 1 ммоль/л PMSF (блокатор протеаз, «Sigma», США) и 0,02% азида натрия, с последующим центрифугированием при 10 000 g в течение 10 мин.

Электрофорез и иммуноблоттинг

Для проведения иммуноблоттинга 10—20 мкл лизата, содержащего 50—70 мкг белка, обработанного диссоциирующим буфером (2% 2-меркаптэтанол и 2% додецилсуль-

фата натрия (SDS)), подвергали электрофорезу в 8% полиакриламидном геле. Белки переносили на нитроцеллюлозный фильтр «Hybond-C-Extra» («Amersham», Великобритания) в электрическом поле напряжением в 2 В/см в течение 20 ч. Фильтры с белками обрабатывали по общепринятой методике. Кроличью сыворотку Ас 3 использовали в разведении 1:1000 [1; 2; 5]. В качестве субстратов для выявления пероксидазы применяли 3,3-диаминобензидин (5 мг в 10 мл) и забуференный физиологический раствор («Диаэм», РФ), к которым добавляли 10 мкл 33% раствора перекиси водорода («Sigma», США) и 4-Cl-1-нафтол (10 мг в 10 мл забуференного физиологического раствора).

Для очистки р34—38 к лизатам образцов рака шейки матки (РШМ) и нормальных тканей шейки матки добавляли раствор 50% сульфата аммония и преципитировали белки по методу, описанному ранее [2]. Полученные белки разделяли с помощью полупрепаративного электрофореза в 8% полиакриламидном геле. Зона, соответствующая маркерам р34—38, была вырезана. Для элюирования белков блоки геля размельчали и обрабатывали диссоциирующим буфером, содержащим 4% 2-меркаптэтанола, с последующим прогреванием при 100°C в течение 3 мин и центрифугированием при 10 000 г в течение 10 мин. Затем проводили электрофорез в 12% полиакриламидном геле с последующим иммуноблоттингом с кроличьей сывороткой Ас 3, сыворотками больных и здоровых доноров в разведении 1:100 и 1:200.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено исследование антител к основному белку HeLa-ассоциированного семейства р34—38 у онкологических больных. Белок р34—38 выделяли элюированием из геля, полученного при полупрепаративном электрофорезе лизатов РШМ. Ранее нами с помощью МКА 1 определена молекулярная масса основного белка HeLa-ассоциированного семейства. Она составила 38 кДа. Однако молекулярная масса белка в последующих экспериментах колебалась от 34 до 38 кДа. После очистки комплекса белков, полученного из лизата нормальных тканей шейки матки, выяснилось, что его молекулярная масса несколько выше таковой комплекса белков, полученного из лизата образцов РШМ. Кроме того, в иммуноблоттинге с кроличьей сывороткой Ас 3 белок не выявлен, несмотря на четкое (по окраске) его выявление на блоте. Отсутствие реакции в элюате нормальных тканей шейки матки можно объяснить либо отсутствием белка, либо иммунологическим различием белков, одинаковых по молекулярной массе, из лизатов образцов РШМ и нормальных тканей шейки матки (рис. 1).

У 3 из 20 больных соматическими заболеваниями и у 1 из 16 здоровых доноров выявлена интенсивная реакция на р65—69 (р34—38) из лизатов образцов РШМ. Антитела к белку с той же молекулярной массой из лизата нормальных тканей шейки матки у тех же больных отсутствовали (рис. 2).

Слабая диффузная реакция на р34—38 была обнаружена в сыворотках 18% больных раком молочной железы (РМЖ) и 17% больных злокачественными опухолями ЖКТ. У здоровых доноров и больных с соматическими заболеваниями аутоантитела к р34—38 из лизатов образцов РШМ отсутствовали. Обнаружена сочетанная

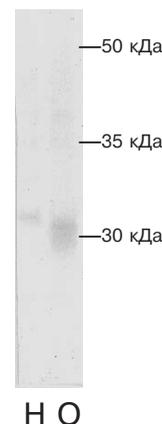


Рис.1 Белки, элюированные из геля после полупрепаративного электрофореза лизатов образцов РШМ (О) и нормальных тканей шейки матки (Н) Окраска «Pons» («Sigma», США).

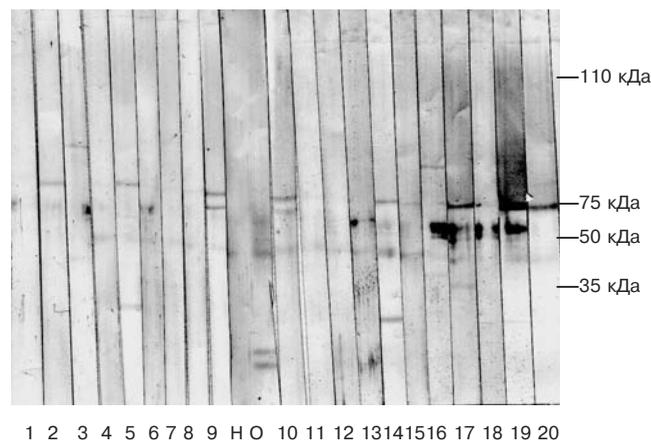


Рисунок 2. Реакция сывороток больных с соматическими заболеваниями (блоты 1—9 и 12—20) и здоровых доноров (блоты 10—11) на р34—38, элюированный из геля после полупрепаративного электрофореза лизатов образцов РШМ (блоты 10—20) и нормальных тканей шейки матки (блоты 1—9).

Н — лизаты нормальных тканей шейки матки, прилежащих к опухоли; О — лизаты образцов РШМ.

интенсивная и умеренная реакция на белки р50—55, р65—69 (р34—38 из лизатов образцов РШМ) у больных злокачественными опухолями ЖКТ (50 и 50% соответственно) и раком легкого (57 и 41% соответственно). У здоровых доноров аутоантитела к р50—55 и р65—69 (р34—38) встречались реже (в 13 и 37% случаев соответственно) (рис. 2, табл. 1).

У больных РМЖ, раком пищевода и желудка обнаружена интенсивная и очень интенсивная реакция на р50—55 (р34—38) из лизатов образцов РШМ. Интенсивная реакция на р65—69 (р34—38) из лизатов образцов РШМ отмечена преимущественно у больных РМЖ. У тех же больных реакция на р50—55, р65—69 (р34—38) из другого образца РШМ была похожей, но менее интенсивной, особенно на р50—55 (сыворотки использованы в разведении 1:100) (рис. 3).

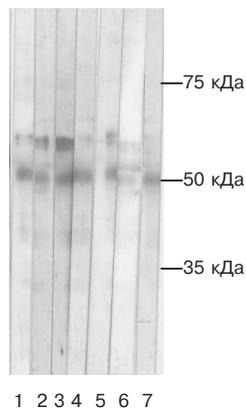


Рисунок 3. Реакция на p50—55 и p65—69 (p34—38) из лизатов образцов РШМ при РМЖ (блоты 1—3), раке пищевода (блоты 4 и 5) и раке желудка (блоты 6 и 7).

Среди других онкологических больных наиболее интенсивная реакция на p50—55, p65—69 (p34—38) при разведении сыворотки 1:200 выявлена у больного с острым лейкозом, у 2 из 6 больных раком гортани и у больной РШМ. У больного с метастазами рака толстой кишки в печени выявлена очень интенсивная фоновая реакция по всему блоту (рис. 4).

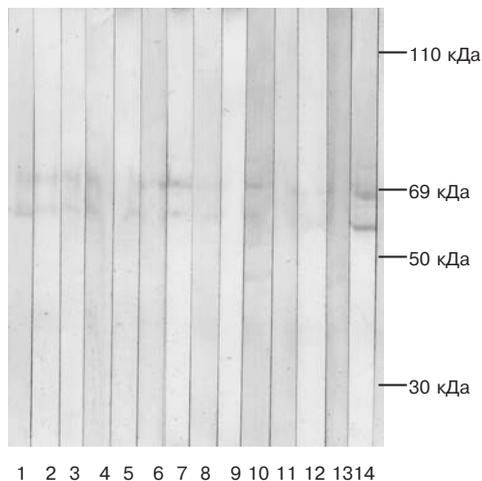


Рисунок 4. Реакция на p50—55, p65—69 (p34—38) из лизатов образцов РШМ.

Рак гортани — блоты 1—3 и 6; рак легкого и лимфома — блоты 4 и 5; злокачественные опухоли почки, кишечника и мочевого пузыря — блоты 7—9; РШМ — блот 10; рак мочевого пузыря и тела матки — блоты 11 и 12; метастазы рака толстой кишки в печени — блот 13; острый лейкоз — блот 14. Сыворотки использованы в разведении 1:200.

В некоторых случаях выявлена положительная реакция на другие белки: на p60—67 — при раке желудка, на p26 —28 — у здоровых доноров, при соматических заболеваниях, РМЖ и опухолях мочеполового тракта, на p39 — при РШМ, на p75—83 — при соматических заболеваниях (рис. 2, табл. 1).

Высокие титры аутоантител к p65—69 (p34—38) у здоровых доноров, возможно, связаны с тем, что данные

белки являются ферментами, принимающими участие, например, в синтезе белков. Содержание этих ферментов могут контролировать аутоантитела по принципу обратной связи. Считается, что «ключевые ферменты часто являются объектом регуляции по типу обратной связи или множественного контроля, они могут быть взаимопревращающимися ферментами и характеризоваться определенным изоферментным спектром». Полагают, что «в нормальных клетках активность и количество ключевых ферментов часто подвержены питательной и гормональной регуляции» [3].

Молекулярная масса белков, на которые выявляются аутоантитела, сходна с молекулярной массой одного из транскрипционных факторов NF-kB, который активирует экспрессию ряда генов. Одним из транскрипционных факторов, выделенных из HeLa-клеток, является фактор IкВ-NF-kB. Это гетеротример, состоящий из полипептидов с молекулярной массой 50, 65 и 37 кДа. При гель-фильтрации его молекулярная масса составляет 150 кДа. У человека ДНК-связывающая субъединица NF-kB представляет собой полипептид с молекулярной массой 50—51 кДа [4; 8]. Возможно, регуляция активности этих ингибиторных белков частично осуществляется по принципу обратной связи, как у ферментов. Этим можно объяснить наличие аутоантител к p50—55 и p65—69, сходным по молекулярной массе и источникам получения с IкВ-NF-kB. Однако выявленные аутоантитела могут представлять собой и аутоантитела к белкам ядерных или поверхностных мембран. Аутоиммунная реакция на белки разрушенных в результате болезни клеток может быть связана с изменением структуры этих белков. Ос-тается неясным, с чем связано повышение синтеза аутоантител к p65—69 (p34—38 из лизатов образцов РШМ) в одних группах онкологических больных и понижение синтеза тех же аутоантител в других группах.

При исследовании антител к p34—38, элюированному из нормальных тканей, прилежащих к опухоли шейки матки, у небольшого числа больных раком гортани обнаружена умеренная и интенсивная реакция на p50—55 (в 4 из 6 наблюдений, 66%) и p65—69 (p34—38) (в 3 из 6 наблюдений, 50%). Эта реакция оказалась более выраженной, чем на белок, выделенный из опухолевой ткани. Таким образом, при раке гортани выявлены аутоантитела к белку p65—69 (p34—36), элюированному как из опухолевых, так и из нормальных тканей шейки матки. У больных с соматическими заболеваниями положительная реакция на p65—69 (p34—38), полученный из нормальных тканей шейки матки, наблюдалась реже (в 4 из 16 наблюдений, 25%). В то же время антитела к p50—55 (p34—38), полученному сходным образом, определялись значительно чаще, чем антитела к белку, элюированному из образцов РШМ (7 из 16 случаев, 60%). У здоровых доноров реакция на p50—55 и p65—69 (p34—38) из нормальных тканей шейки матки практически отсутствовала. В табл. 2 представлена реакция онкологических больных, больных с соматическими заболеваниями и здоровых доноров на белки, элюированные из образцов РШМ (табл. 2).

Как мы уже отмечали, аутоиммунные реакции у онкологических больных изучены недостаточно. Недавно у больных эндометриодными опухолями выявлены аутоантитела к α - и β -изоформам киназы p70S6K (молекулярная

Таблица 1

Выявление аутоантител к белкам лизатов образцов РШМ методом иммуноблоттинга у онкологических больных, больных с соматическими заболеваниями и здоровых доноров^а

	p34 ^б	p50—55	p65—69	Другие эпитопы
Рак молочной железы	4/23 (18)	6/23 (26)	9/23 (40)	p < 20 p ~ 26—28
Опухоли ЖКТ	4/24 (17) ^в	12/24 (50) ^в	12/24 (50) ^г	p60—67 3/24 (14) ^в
Опухоли мочеполовой системы	1/18 (6) ^д	6/18 (37) ^д	5/18 (31) ^д	p ~ 26—28 p39 ^е
Рак легкого	0/7 (0)	4/7 (57)	3/7 (41)	—
Опухоли кожи и костей	0/10 (0)	5/10 (50)	2/10 (20)	—
Лимфопролиферативные заболевания	3/16 (19)	7/16 (44)	9/16 (56)	—
Соматические заболевания	1/20 (5)	4/20 (20)	9/20 (45)	p < 20 p ~ 26—28
Здоровые доноры	0/16 (0)	2/16 (13)	6/16 (37)	p < 20 p ~ 26—28 p60—67 p75—83

^а В скобках указаны проценты.

^б Выявляется преимущественно у больных.

^в Рак желудка, рак печени.

^г Рак желудка, рак гортани, рак пищевода.

^д Рак яичников.

^е РШМ

масса 70 и 85 кДа). Эта киназа является одним из главных регуляторов трансляции некоторых компонентов системы синтеза белка (она фосфорилирует рибосомный белок S6). Нарушения контроля трансляции проявляются в изменении функциональной активности клеток и клеточного роста и в большинстве случаев ведут к злокачественной трансформации. В настоящее время известны две изоформы киназы p70S6K — p70S6Ka и p70S6Kb (гомология 70%). Амплификация и гиперэкспрессия гена, кодирующего киназу p70S6K, наблюдаются при раке молочной железы. Высокая частота экспрессии p70S6K и Akt, а также их активное фосфорилирование обнаружены при опухолях щитовидной железы. Предполагается, что эти белки могут участвовать в опухолевой прогрессии. Они стимулируют клеточную пролиферацию и подавляют апоптоз за счет фосфорилирования проапоптотических факторов.

Методом иммуноблоттинга авторами выявлена гиперэкспрессия p70S6Ka и p70S6Kb в 56 и 67% образцах аденокарцином тела матки соответственно. Уровень мРНК p70S6Kb в опухолях эндометрия превышал таковой

Таблица 2

Выявление аутоантител к белкам лизатов нормальных тканей шейки матки методом иммуноблоттинга у онкологических больных, соматических больных и здоровых доноров^а

	p34 ^б	p50—55	p65—69	Другие эпитопы
Рак гортани	—	4/6 (+) (66) ^в	3/6 (50)	p ~ 26—28
Рак шейки тела матки	—	—	—	p39 ^г p75—83 (2/6)
Соматические заболевания	—	7/16 (60)	4/16 (25)	p ~ 26—28 p43
Здоровые доноры	—	1/3 (+)	—	p60—67 (1/3) (+)

^а В скобках указаны проценты.

^б Выявляется преимущественно у больных.

^в (+) — интенсивность выявления реакции (слабая реакция).

^г РШМ.

p70S6Ka и коррелировал с экспрессией белка. Анализ аутоиммунного ответа на p70S6Ka выявил стабильный титр аутоантител к p70S6Ka в сыворотке больных раком тела матки по сравнению со здоровыми донорами.

Повышение экспрессии p70S6K выявлено иммуногистохимическим методом в опухолях щитовидной железы человека по сравнению с нормальными тканями. Методом иммуноблоттинга обнаружено повышение уровня p70S6K в некоторых образцах клеточных линий рака молочной железы [6; 7]. Предполагают, что аутоиммунный ответ на p70S6Ka может наблюдаться при опухолях поздних стадий [6]. Однако, по нашим данным, эти аутоантитела часто выявляются и у здоровых доноров (37%).

Таким образом, нами выявлено, что при РМЖ и злокачественных опухолях ЖКТ в 18 и 17% случаев соответственно при иммуноблоттинге с сыворотками в разведении 1:100 определяется слабая диффузная реакция в районе p34—38. По сравнению со здоровыми донорами, больными с соматическими заболеваниями и опухолями другой локализации при злокачественных опухолях ЖКТ, раке легкого и лимфопролиферативных заболеваниях выявлена сочетанная положительная иммунологическая реакция на p50—55, p65—69 (p34—38 из лизатов образцов РШМ). Наиболее интенсивная реакция на p50—55, p65—69 (p34—38 из лизатов образцов РШМ) при использовании сывороток в разведении 1:100 наблюдается у больных РМЖ, раком желудка и пищевода, а при использовании сывороток в разведении 1:200 — у больных острым лейкозом, у 2 из 6 больных раком гортани и у больного с метастазами рака толстой кишки в печени. У некоторых больных с соматическими заболеваниями и у одного здорового донора выявлена интенсивная реакция на p65169 (p34—38) лизатов образцов РШМ. Реакция на белок с той же молекулярной массой из лизатов нормальных тканей шейки матки у этих больных отсутствовала. У 3 из 6 больных раком гортани обнаружена положительная реакция на p50—55 и p65—69 (p34—38), полученные как из образцов РШМ, так и из нормальных тканей шейки матки.

Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить причины появления аутоантител к p50—55 и p65—69 (p34—38) при злокачественных опухолях ЖКТ, раке легкого и лимфопролиферативных заболеваниях и оценить возможности применения полученных данных для серологической диагностики и/или мониторинга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боброва Т. С., Чуев Ю. В. HeLa-ассоциированный антиген-2. Локализация в нормальных и опухолевых тканях // Эксп. онкол. — 1997. — Т. 19. — С. 129—133.
2. Боброва Т. С., Чуев Ю. В., Морозов В. А. Иммунологические и биохимические характеристики семейства белков, ассоциированных с некоторыми карциномами человека // Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. — 2001. — №3. — С. 25—31.
3. Вебер Дж. Упорядоченная биохимическая программа экспрес-

сии гена в раковых клетках // Биохимия. — 2001. — Т. 66. — С. 1438—1449.

4. Baueerle P. A., Baltimore D. A 65-kD subunit of active NF-kB is required for inhibition of NF-kB by Ikb // Genes Dev. — 1989. — Vol. 3. — P. 1689—1698.

5. Laemmly U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4 // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680.

6. Lytvyn D. I., Dudchenko T. M., Lyzogubov V. V. et al. Expression of alpha- and beta- isoforms of p70S6 kinase in human endometrial tumors // Exp. Oncol. — 2003. — Vol. 25. — P. 274—278.

7. Lyzogubov V. V., Usenko V. S., Khojaenko Yu. S. et al. Immunohistochemical analysis of p70S6 kinase-alpha in human thyroid tissue upon pathology // Exp. Oncol. — 2003. — Vol. 25. — P. 304—306.

8. Zabel U., Baeuerle P. A. Purified human Ikb can rapidly dissociate the complex of the NF-kB transcription factor with its cognate DNA // Cell. — 1990. — Vol. 63. — P. 255—265.

Поступила 30.11.2005

T. S. Bobrova, Yu. V. Chuyev, V. E. Shevchenko
HeLa-ASSOCIATED PROTEIN FAMILY: IMMUNE RESPONSE STUDY
Carcinogenesis Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

The purpose of this study was to analyze response in humans to purified p34 of normal and tumor tissue lysates from cervical cancer patients. Sera from cancer patients and normal donors were analyzed by immunoblotting. Antibodies to p50—55, p65—69 (purified p34 subunits) were found in sera from patients with lymphoid, gastrointestinal and lung tumors. Antibodies to p50—55, p65—69 in 1:100 dilution were present in breast, gastric and esophageal cancer, and those in 1:200 dilution were discovered in acute leukemia, in 2 of 6 cases with laryngeal carcinoma and in a patient with colon cancer and liver metastases. Three of 20 cancer patients and 1 of 16 healthy donors had antibodies to p65-69 from cervical cancer lysate and no antibodies to the protein of the same molecular weight from normal tissue lysate. Sera from 4 of 6 laryngeal cancer patients reacted similarly with p50—55 and p65—69 from normal and tumor tissues. Further study will elucidate reasons of the presence of antibodies to p50—55 and p65—69 in cancer patients as well as utility of these findings for serological diagnosis.

Key words: tumor-associated proteins, immunoblotting, Western blotting, autoantibodies.