
КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК: 616-006:577.27

НОВОЕ МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННОГО БЕЛКА РМЕРА1

В.В. Волкоморов^{1,2}, Е.С. Григорьева^{1,2}, М.С. Карбышев³, И.В. Митрофанова⁴,
Е.В. Кайгородова^{1,2}, Н.В. Чердынцева^{1,2}

*ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, г. Томск¹
Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск²
Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск³
Международный биотехнологический центр «Генериум», Владимирская обл.,
Петушинский р-н, пос. Вольгинский⁴
634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5,
e-mail: grigorieva@oncology.tomsk.ru¹*

Получено новое моноклональное антитело (мкАТ) к опухоль-ассоциированному белку РМЕРА1 (Prostate Transmembrane Protein, Androgen Induced 1), для которого показана дифференциальная экспрессия в ряде опухолей. Для тестирования специфичности нового мкАТ нами получен полноразмерный рекомбинантный белок РМЕРА1 в трансфицированной клеточной линии Нек293Т. После трансфекции плазмидным вектором pIRES-EGFP, содержащим вставку гена РМЕРА1, проводили оценку экспрессии белка РМЕРА1 в клетках линии НЕК293Т с помощью иммуноцитохимического исследования и вестерн-блот анализа. Способность нового мкАТ связывать РМЕРА1 в клиническом материале показана с помощью иммуногистохимического исследования на срезах ткани простаты, как положительного контроля. Новое антитело может послужить основой для создания коммерческого антитела для тестирования белка РМЕРА1 в биологических образцах человека.

Ключевые слова: РМЕРА1, моноклональные антитела, экспрессия, белковые маркеры

NEW MONOCLONAL ANTIBODY FOR TUMOR-ASSOCIATED PROTEIN PMEPA1 DETECTION

V.V. Volkomorov^{1,2}, E.S. Grigoryeva^{1,2}, M.S. Karbyshev³, I.V. Mitrofanova⁴,
E.V. Kaigorodova^{1,2}, N.V. Cherdyntseva^{1,2}

*Cancer Research Institute of Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk¹
National Research Tomsk State University, Tomsk²
Siberian State Medical University, Tomsk³
International Biotechnology Center «Generium», Petushinski district, Volginsky village⁴
5, Kooperativny Street, 634050-Tomsk, Russia,
e-mail: grigorieva@oncology.tomsk.ru¹*

We obtained a new monoclonal antibody (mAb) against tumor-associated protein PMEPA1 (Prostate Transmembrane Protein, Androgen Induced 1) for which is shown differential expression in some tumors. To test the specificity of obtained mAb we have produced a full-length recombinant PMEPA1 in transfected HEK293T cell line. After transfection of the plasmid vector pIRES-EGFP, containing the insertion coding *PMEPA1* gene we evaluated PMEPA1 protein expression in HEK293T cells lines by immunocytochemical study and western-blot analysis. Ability of the new mAb binds PMEPA1 in clinical specimens is shown by immunohistochemistry on histological sections of prostate tissue used as positive control. New antibody may provide a basis for development of commercial antibody test for evaluation of protein expression in human biological samples.

Key words: PMEPA1, monoclonal antibodies, expression, protein markers.

РМЕРА1 (Prostate Transmembrane Protein, Androgen Induced 1) является трансмембранным

белком, обратившим на себя внимание исследователей в связи с его вовлеченностью в сигнальный

путь трансформирующего фактора роста β (TGF- β) [2, 8]. Сигнальный путь TGF- β играет ключевую роль в процессах клеточного роста, дифференцировки, апоптоза, вовлечен в регуляцию иммунного ответа, формирование злокачественных опухолей и их метастазирование. TGF- β функционирует как промотор опухолевой прогрессии путем индукции эпителиально-мезенхимального перехода, в результате которого опухолевые клетки приобретают способность к метастазированию [7]. Механизмы, лежащие в основе рецепторной активации и экспрессии генов, вовлеченных в сигнальные пути гена TGF- β , широко освещены в литературе [12]. Одним из белков, чья экспрессия непосредственно индуцируется в результате активации TGF- β сигнального пути, является РМЕРА1 [2]. Кроме того, известно, что РМЕРА1 может непосредственно связываться с молекулами R-Smad (Smad 2 и 3), которые являются посредниками в передаче сигнала от молекулы рецептора TGF- β в ядро, тем самым блокируя трансдукцию сигнала [14, 15].

Анализ имеющихся в литературе данных о функции белка РМЕРА1 определил его важное значение в процессах пролиферации и дифференцировки ряда тканей эпителиального происхождения, что позволило говорить о роли РМЕРА1 в развитии злокачественных новообразований различных локализаций. Существующие разрозненные данные свидетельствуют в пользу весьма неоднозначной роли данного белка в онкогенезе, требующей более детального уточнения. Повышенная экспрессия гена РМЕРА1 в опухолевой ткани отмечается у больных раком почки, легкого, толстой кишки, поджелудочной железы, яичников и молочной железы [2, 3, 7, 10]. При сравнении полнотранскриптомных профилей инвазивных опухолей простаты с нормальными тканями (или преинвазивными опухолями) было обнаружено, что РМЕРА1 высоко экспрессируется в тканях опухолей, склонных к инвазивному росту. Соответственно, повышение его экспрессии ассоциировано с плохим прогнозом клинического течения заболевания [14]. В то же время другие авторы, исследующие роль РМЕРА1 при раке простаты, приводят данные об увеличении вероятности прогрессии заболевания при снижении экспрессии РМЕРА1 [6]. Вероятно, критическую роль при этом играют изменения рецепторного аппарата к андрогенам, которые наряду с TGF- β напрямую регулируют экспрессию РМЕРА1 в ткани

простаты. Исходя из того, что существуют некоторые органоспецифичные особенности характера экспрессии РМЕРА1, необходимо уточнение его роли при каждой отдельной локализации злокачественного процесса.

Согласно нашим данным, РМЕРА1 является потенциальным маркером аденокарциномы желудка интестинального типа, что было установлено на основании проведенного биоинформатического поиска генов, обладающих более высокой экспрессией в опухоли по сравнению с неизменной тканью [4, 5, 13]. Повышенная экспрессия гена РМЕРА1 в опухолевой ткани желудка была подтверждена нами на собственной коллекции парных образцов нормальной и опухолевой ткани, полученных от больных с аденокарциномой желудка при операции. Наши данные подтверждают результаты других авторов о повышении генной экспрессии РМЕРА1 в аденокарциномах желудка [10].

В имеющейся литературе нам не удалось обнаружить информацию по исследованию белковой экспрессии РМЕРА1 в операционном клиническом материале, а соответственно, и о коммерчески доступных антителах, обладающих специфичностью для достоверной детекции РМЕРА1 в тканях. В то же время проведенные нами предварительные исследования показали неэффективность использования ряда коммерческих антител для детекции РМЕРА1 в экстрактах тканей и на гистологических срезах.

Это обусловило актуальность получения высокоспецифичных антител к РМЕРА1, которые бы могли детектировать этот белок в клинических образцах биологического материала.

Цель исследования: получение нового моноклонального антитела к опухоль-ассоциированному белку РМЕРА1 и подтверждение его специфичности.

Материал и методы

Получение гибридов мкАТ против РМЕРА1. В качестве антигена при иммунизации крыс использовался синтетический пептид ²⁷⁵WSKEKDKQKGHPL²⁸⁷, конъюгированный с бычьим сывороточным альбумином и овальбумином (PSL, Германия). Подкожная и внутрибрюшинная иммунизация проводилась смесью 50 мкг пептида, 500 мкл фосфатно-солевого буфера и 500 мкл неполного адьюванта Фрейда (НАФ), содержащей 5 нМ CpG олигонуклеотида (Tib Mol-biol, Германия). Спустя шесть недель проводилась

повторная иммунизация раствором, не содержащим НАФ. Гибридизация лимфоцитов проводилась по стандартной методике [11]. мкАТ, показывающие специфическую активность против РМЕРА1, подвергались дальнейшему анализу с помощью иммуноблота.

Очистка полученных мкАТ. Перед нанесением образца сорбент уравнивали фосфатно-солевым буфером (5 объемов хроматографической колонки), рН 7,2–7,4 до выхода оптической плотности, проводимости и рН на постоянные значения. Культуральную жидкость наносили на сорбент MabSelect Sure со скоростью 0,25 мл/мин. По окончании нанесения сорбент промывали стартовым буфером (5 объемов хроматографической колонки) со скоростью 0,5 мл/мин. Белок элюировали буфером, содержащим 50 мМ CH_3COONa и 100 мМ L-Arg, рН 2,8, который подавали на колонку реверсивным током. Фракцию, содержащую целевое мкАТ, собирали в стерильный флакон и доводили рН до 6,5–7,0 раствором 2М Tris.

Получение рекомбинантного белка РМЕРА1 в культуре клеток линии НЕК293Т. Полноразмерный ген РМЕРА1 амплифицировали с использованием специфических праймеров, в состав которых вводили сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции NheI и EcoRI и клонировали в плазмиду pIRES-EGFP (Clontech, США). Транфекция проводилась кальций-фосфатным методом.

Иммуноблоттинг. Клеточные лизаты подвергали электрофоретическому разделению по методу Лэммли в градиентном полиакриламидном геле (10–20 %). После разделения белки подвергали электропереносу на поливинил-дифторидную мембрану Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore, США), используя Mini Trans-Blot transfer cell (Bio-Rad, США) в соответствии с рекомендациями производителя. При исследовании образцов специфическую реакцию определяли на пленке для выявления хемолуминесценции с помощью ECL Plus Western Blotting Detection System.

Иммуноцитохимическое исследование. Способность полученных мкАТ к связыванию белка РМЕРА1 была проанализирована с помощью иммуноцитохимии. Клетки, выращенные на покровных стеклах, промывали фосфатно-солевым буфером. Фиксация и пермеабиллизация проводились абсолютным ацетоном при -20°C в течение 5 мин. В качестве вторичных антител использовали

овечьи антитела к IgG кролика, конъюгированные с родамином в разведении 1:300. Визуализация проводилась с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager Z1 с системой для улучшения контрастности ApoTome (Carl Zeiss, Германия). Изображения регистрировали с помощью камеры AxioCam MRm (Carl Zeiss, Германия).

Иммуногистохимическое исследование. В качестве материала для тестирования использовали депарафинизированные срезы тканей рака простаты 2 пациентов. Операционный материал фиксировали 10 % формалином, забуференным фосфатным буфером в течение 24 ч. Связавшиеся антитела выявляли, используя козьи антитела против первичных антител, конъюгированные с пероксидазой хрена, в разведении 1:100, раствор которых наносили на срезы на 30 мин. Для визуализации специфической реакции использовали Liquid DAB (Dako, Дания).

Результаты и обсуждение

Получение мкАТ, обладающих специфичностью к опухоль-ассоциированному белку РМЕРА1. Первоначально РМЕРА1 был идентифицирован как ген, экспрессия которого находится под контролем стероидных гормонов в ткани предстательной железы [16]. Основной белковый продукт гена РМЕРА1 содержит 287 аминокислотных остатков, являясь самой длинной формой, состоит из экстрацеллюлярного домена (40 аминокислот), трансмембранного домена (28 аминокислот) и длинного цитоплазматического «хвоста» (227 аминокислот) (рис. 1).

Для получения специфичных к РМЕРА1 мкАТ нами был выполнен поиск участков локализации антигенных детерминант, топологически наиболее доступных для взаимодействия антител с выявленным мембранным белком. В качестве антигена использовался синтетический пептид $^{275}\text{WSKEKDKQKGHPL}^{287}$, представляющий собой С-концевую цитоплазматическую часть белка РМЕРА1 (рис. 1). Полученные мкАТ были очищены с помощью сорбента MabSelect (GE Healthcare, США) и протестированы на способность специфически связывать рекомбинантный белок РМЕРА1 в лизатах клеток линии Нек293Т, транзитивно экспрессирующих РМЕРА1 (рис. 2).

Тестирование специфичности полученных мкАТ против белка РМЕРА1. Клетки линии Нек293Т трансфецировали экспрессионным векто-

	10	20	30	40	50	60
	MHRLMGVNST	AAAAAGQPNV	SCTCNCKRSL	FQSMEITELE	FVQIIIVVV	MMVMVVVITC
	70	80	90	100	110	120
	LLSHYKLSAR	SFISRHSQGR	RREDALSSEG	CLWPSESTVS	GNGIPEPVVY	APPRPTDRLA
	130	140	150	160	170	180
	VPPFAQRERF	HRFQPTYPYL	QHEIDLPTTI	SLSDGEEPPP	YQGPCTLQLR	DPEQQLELNR
	190	200	210	220	230	240
	ESVRAPPNRT	IFDSLMDSA	RLGGPCPPSS	NSGISATCYG	SGRMEGPPP	TYSEVIGHYP
	250	260	270	280		
	GSSFQHQSS	GPPSLLEGTR	LHHTHIAPLE	SAIWSKEKD KQKGHPL		

Рис. 1. Аминокислотная последовательность канонической формы РМЕРА1, синтезированный фрагмент выделен жирным шрифтом

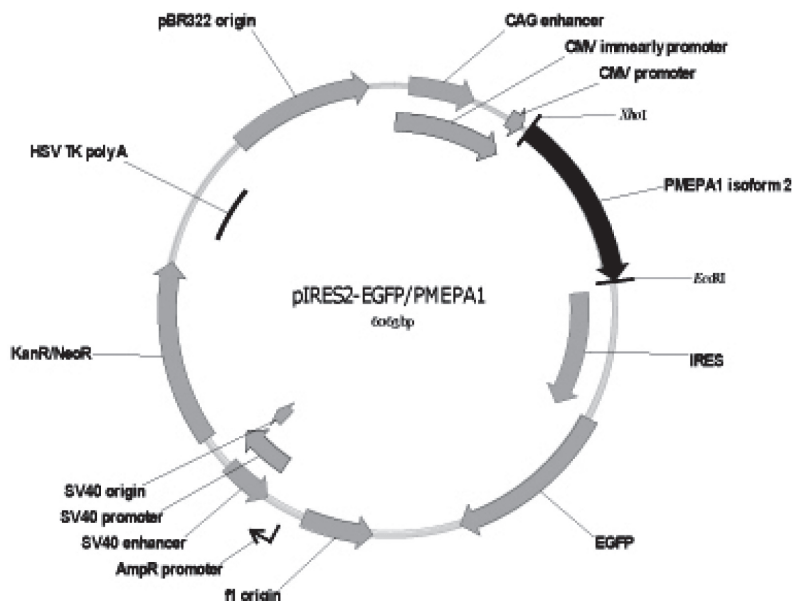


Рис. 2. Схема строения экспрессионной плазмиды pIRES-EGFP-PMEPA1

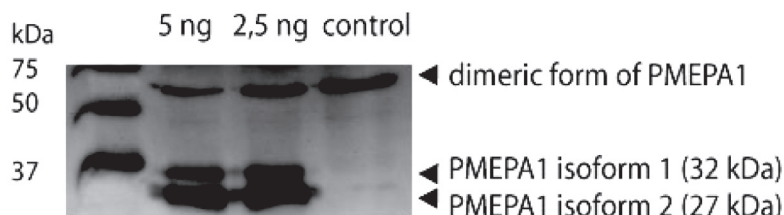


Рис. 3. Результат вестерн-блот анализа лизата трансфицированных клеток линии Нек293Т различным количеством экспрессионного вектора

ром pIRES-EGFP, содержащим вставку, кодирующую полноразмерный белок РМЕРА1, после чего лизировали RIPA буфером. Методом вестерн-блот

анализа проводили детекцию целевого белка с использованием полученных мкАТ. На рис. 3 видно, что мкАТ, помимо связывания с двумя изоформами

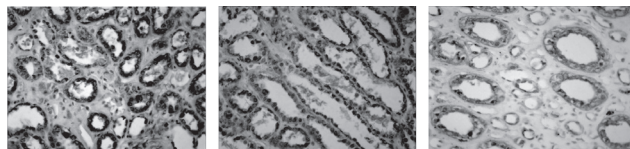


Рис. 4. Иммуногистохимическое исследование экспрессии белка PMEPA1 в ткани простаты с использованием полученных мкАТ, $\times 200$

РМЕРА1, специфически связывают белок, молекулярная масса которого приблизительно равна 65 kDa. Вероятно, этот бэнд соответствует димерной форме белка РМЕРА1. В литературе нет достоверных сведений о функциональной димеризации РМЕРА1, однако известно, что другие мембранные белки, имеющие сходную структуру, обладают такой способностью [1].

Способность полученных антител распознавать целевой белок в клетках линии НЕК293Т оценивали с помощью метода иммуноцитохимии. Визуализацию проводили с помощью антивидовых конъюгатов, меченных родамином. Трансфецированные клетки, содержащие генетическую конструкцию pIRES-EGFP-РМЕРА1, характеризовались более высоким уровнем флуоресценции, по сравнению с нетрансфецированными контрольными клетками. В иммуноцитохимическом исследовании мкАТ выявляют цитоплазматическую локализацию белка РМЕРА1.

Для оценки специфичности и пригодности применения полученных мкАТ для детекции РМЕРА1 в клинических образцах нами был использован иммуногистохимический анализ срезов ткани из парафиновых срезов (рис. 4). В качестве положительного контроля, то есть ткани, имеющей стабильно высокую экспрессию белка РМЕРА1, была выбрана нормальная ткань простаты [16]. Из рис. 4 видно, что наблюдается выраженная ядерно-цитоплазматическая экспрессия РМЕРА1. Локализация белка РМЕРА1 в непосредственной близости от аппарата Гольджи, которая визуализируется как ядерно-цитоплазматическое окрашивание, отмечалась и в исследованиях экспрессии РМЕРА1 в других типах тканей [9].

Заключение

Нами получено новое моноклональное анти-тело против опухоли-ассоциированного белка РМЕРА1, вовлеченного в TGF- β сигнальный путь, играющего важную роль в процессе эпителиально-

мезенхимального перехода. Полученные мкАТ обладают достаточной чувствительностью для детекции РМЕРА1 в клиническом материале и выявления особенностей его экспрессии в различных тканях. Новое анти-тело может послужить основой для создания коммерческого анти-тела для тестирования белка РМЕРА1 в биологических образцах человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brennan P.J., Kumagai T., Berezov A., Murali R., Greene M. HER2/Neu: mechanisms of dimerization/oligomerization // *Oncogene*. 2002. Vol. 21 (2). P. 328. doi: 10.1038/sj/onc/1205119.
2. Brunschwig E.B., Wilson K., Mack D., Dawson D., Lawrence E., Willson J.K., Lu S., Nosrati A., Rerko R.M., Swinler S., Beard L., Lutterbaugh J.D., Willis J., Platzer P., Markowitz S. PMEPA1, a transforming growth factor-beta-induced marker of terminal colonocyte differentiation whose expression is maintained in primary and metastatic colon cancer // *Cancer Res*. Vol. 63 (7). P. 1568–1575.
3. Giannini G., Ambrosini M.I., Di Marcotullio L., Cerignoli F., Zani M., MacKay A.R., Screpanti I., Frati L., Gulino A. EGF- and cell-cycle-regulated STAG1/PMEPA1/ERG1.2 belongs to a conserved gene family and is overexpressed and amplified in breast and ovarian cancer // *Mol. Cell. Carcinog.* 2003. Vol. 38 (4). P. 188–200. doi: 10.1002/mc.10162.
4. Grigor'eva E.S., Bukurova Iu.A., Krasnov G.S., Afanas'ev S.G., Cherdyn'tseva N.V., Tuzikov S.A., Choizonov E.L., Karpov V.L., Lisitsyn N.A., Beresten' S.F. Identification of proteins overexpressed in malignant gastric tumors: comparison of the results of 2-De and bioinformatics search // *Mol. Biol. (Mosk)*. 2011. Vol. 45 (4). P. 738–743. DOI:10.1134/S0026893311030058.
5. Grigoryeva E.S., Cherdyn'tseva N.V., Karbyshev M.S., Volkomorov V.V., Stepanov I.V., Zavyalova M.V., Perelmuter V.M., Buldakov M.A., Afanas'ev S.G., Tuzikov S.A., Bukurova Y.A., Lisitsyn N.A., Beresten S.F. Expression of Cyclophilin A in Gastric Adenocarcinoma Patients and Its Inverse Association with Local Relapses and Distant Metastasis // *Pathol. Oncol. Res*. 2013. [Epub ahead of print]. doi:10.1007/s12253-013-9718-x.
6. Hirokawa Y.S., Takagi A., Uchida K., Kozuka Y., Yoneda M., Watanabe M., Shiraishi T. High level expression of STAG1/PMEPA1 in an androgen-independent prostate cancer PC3 subclone // *Cell Mol. Biol. Lett*. 2007. Vol. 12 (3). P. 370–377. doi: 10.2478/s11658-007-0009-y.
7. Hu Y., He K., Wang D., Yuan X., Liu Y., Ji H., Song J. TMEPA1 regulates EMT in lung cancer cells by modulating the ROS and IRS-1 signaling pathways // *Carcinogenesis*. 2013. Vol. 34 (8). P. 1764–1772. doi: 10.1093/carcin/bgt132.
8. Itoh S., Itoh F. Inhibitory machinery for the TGF- β family signaling pathway // *Growth Factors*. 2011. Vol. 29 (5). P. 163–173. doi: 10.3109/08977194.2011.614236.
9. Moul J., Srivastava S., Xu L. Patent US 20040092469 A1. Androgen-regulated PMEPA1 gene and polypeptides. 13.05.2004.
10. Rae F.K., Hooper J.D., Nicol D.L., Clements J.A. Characterization of a novel gene, STAG1/PMEPA1, upregulated in renal cell carcinoma and other solid tumors // *Mol. Cell. Carcinog.* 2001. Vol. 32 (1). P. 44–53. doi: 10.1002/mc.1063.
11. Rottach A., Kremmer E., Nowak D., Boisguerin P., Volkmer R., Cardoso M.C., Leonhardt H., Rothbauer U. Generation and characterization of a rat monoclonal antibody specific for PCNA // *Hybridoma (Larchmt)*. 2008. Vol. 27 (2). P. 91–98. doi: 10.1089/hyb.2008.0031.
12. Shi Y., Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus // *Cell*. 2003. Vol. 113 (6). P. 685–700. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00432-X.
13. Volkomorov V., Grigoryeva E., Krasnov G., Litviakov N., Tsyganov M., Karbyshev M., Zavyalova M., Afanas'ev S., Cherdyn-

tseva N., Lisitsyn N., Beresten S. Search for potential gastric cancer markers using miRNA databases and gene expression analysis // *Exp Oncol.* 2013. Vol. 35 (1). P. 2–7.

14. *Vo Nguyen T.T., Watanabe Y., Shiba A., Noguchi M., Itoh S., Kato M.* TMEPA1/PMEPA1 enhances tumorigenic activities in lung cancer cells // *Cancer Sci.* 2014. Vol. 105 (3). P. 334–341. doi: 10.1111/cas.12355.

15. *Watanabe Y., Itoh S., Goto T., Ohnishi E., Inamitsu M., Itoh F., Satoh K., Wiercinska E., Yang W., Shi L., Tanaka A., Nakano N., Mommaas A.M., Shibuya H., Ten Dijke P., Kato M.* TMEPA1, a transmembrane TGF-beta-inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF-beta signaling // *Mol. Cell.* 2010. Vol. 37 (1). P. 123–134. doi: 10.1016/j.molcel.2009.10.028.

16. *Xu L.L., Shanmugam N., Segawa T., Sesterhenn I.A., McLeod D.G., Moul J.W., Srivastava S.* A novel androgen-regulated gene, PMEPA1, located on chromosome 20q13 exhibits high level expression in prostate // *Genomics.* 2000. Vol. 66 (3). P. 257–263. doi: 10.1006/geno.2000.6214

Поступила 17.04.14