

РАЗРАБОТКА НОВОГО МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К ХИТИНАЗОПОДОБНОМУ БЕЛКУ YKL-39 ДЛЯ ИММУНОГИСТОХИМИИ

А.Н. Грачев¹, Д.В. Самойлова¹, С.Н. Курочкин², О.В. Ковалева¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

²ООО «ПраймБиоМед»; Россия, 117246 Москва, Научный пр-д, 20, стр. 3

Контакты: Алексей Николаевич Грачев alexei.gratchev@gmail.com

Введение. Хитиназоподобные белки у млекопитающих образуются в зоне воспаления и опухолевого роста. Отдельные представители семейства хитиназоподобных белков изучаются как потенциальные биомаркеры опухолей (глиомы, рака предстательной железы и яичников). Одним из охарактеризованных белков данного класса является YKL-39. Известный также как хитиназа-3-подобный белок 2, YKL-39 представляет собой секреторный белок хондроцитов, принадлежащий к семейству гликозил-гидролазы 18. Его самая высокая экспрессия наблюдается в хондроцитах, синовиоцитах, легких и сердце, а также в макрофагах.

Цель исследования — получение антител к человеческому YKL-39, применимых в широком спектре методов.

Материалы и методы. Используя рекомбинантный полноразмерный человеческий YKL-39 в качестве антигена, методом гибридомной технологии мы получили мышинные моноклональные антитела 1B2G4, которые специфически связываются с YKL-39 в иммуноферментном анализе.

Результаты и заключение. Полученные антитела были успешно протестированы с использованием методов иммуноблоттинга, иммуноцитохимии, иммунофлуоресценции и иммуногистохимии с использованием парафиновых срезов. Установлено, что антитела связываются с полноразмерным белком YKL-39 и не взаимодействуют с другими хитиназоподобными белками.

Ключевые слова: моноклональные антитела, хитиназоподобные белки, иммуногистохимический метод

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-27-31

DEVELOPMENT OF A NOVEL MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST CHITINASE-LIKE PROTEIN YKL-39 APPLICABLE FOR IMMUNOHISTOCHEMISTRY

A.N. Gratchev¹, D.V. Samoilova¹, S.N. Kurochkin², O.V. Kovaleva¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia;

²PrimeBioMed; Build. 20, 3 Nauchnij Proezd, Moscow 117246, Russia

Introduction. Mammalian chitinase-like proteins are produced in the areas of inflammation and in tumors. Some members of chitinase-like proteins family are studied as potential biomarkers of tumors (glioma, prostate and ovary). YKL-39 also known as chitinase-3-like 2 (CHI3L2) is a secreted protein produced by chondrocytes. Its high expression is also found in synoviocytes, lung heart and macrophages.

The aim of this study was the development of highly specific monoclonal antibodies against human YKL-39.

Materials and methods. Using recombinant full-length human YKL-39 as immunogen using hybridoma technology we have generated monoclonal antibody 1B2G4, that specifically binds YKL-39 in ELISA.

Results and conclusion. Obtained antibody was successfully tested in Western blot, immunocytochemistry, immunofluorescence and immunohistochemistry on FFPE sections. It was shown that the antibody binds the full-length YKL-39 protein and does not interact with other chitinase-like proteins.

Key words: monoclonal antibody, chitinase-like protein, immunohistochemistry

Введение

Проблема точной диагностики онкологических заболеваний сохраняет актуальность на протяжении нескольких десятилетий. В качестве маркеров для

диагностики используются белки, нуклеиновые кислоты, везикулы, секретируемые опухолевыми клетками, а также сами опухолевые клетки. Стандартные иммуноцитохимические и иммуногистохимические

методы анализа с использованием антител к известным белкам-маркерам опухоли позволяют классифицировать тип новообразований, оценить степень их злокачественности и определить стратегию терапии.

Хитиназоподобные белки (ХПБ) у млекопитающих часто образуются в зоне воспаления и опухолевого роста. В последнее время отдельные представители семейства изучаются как потенциальные биомаркеры различных заболеваний человека, в том числе солидных опухолей (глиомы, рака предстательной железы и яичников). Одним из охарактеризованных белков данного класса является YKL-39. Известный также как хитиназа-3-подобный белок 2 (CHI3L2), YKL-39 представляет собой секреторный белок хондроцитов, принадлежащий к семейству гликозил-гидролазы 18. Его самая высокая экспрессия наблюдается в хондроцитах, синовиоцитах, в легких и сердце, а также в макрофагах. В последних экспрессия YKL-39 стимулируется трансформирующим фактором роста бета [1]. На сегодняшний день YKL-39 может считаться маркером остеоартрита и обнаруживается в синовиальной жидкости и сыворотке крови пациентов [2–4]. Повышенный уровень экспрессии гена YKL-39 выявлен у пациентов с болезнью Альцгеймера и в глиобластомах [5]. Какую функцию выполняет данный белок в глиобластомах на данный момент, неизвестно, однако предполагают, что он может отвечать за пролиферативную способность клеток и ремоделирование внеклеточного матрикса [6]. Также показано, что YKL-39 является проангиогенным фактором и хемоаттрактантом для моноцитов, способствующим метастазированию. У пациентов с раком молочной железы повышенный уровень экспрессии YKL-39 после неoadъювантной химиотерапии указывает на высокий риск метастазирования и плохой ответ на терапию [7]. За счет того, что данный белок секретируем, на него возлагают надежды как на потенциальный маркер, пригодный для ранней диагностики. Существуют данные, доказывающие, что внесение ХПБ в панель маркеров различных тестов приводит к повышению их чувствительности и специфичности.

Цель исследования – разработка нового моноклонального антитела, обладающего специфичностью к белку YKL-39 человека, которое может быть использовано в иммунодиагностике и прогностической оценке течения опухолевых заболеваний у человека.

Материалы и методы

Культивирование клеток

В исследовании была использована клеточная линия глиобластомы человека LN229. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе (при 37 °С, в атмосфере 5 % CO₂). В качестве среды для культивирования

применяли DMEM с добавлением 0,294 мг/мл L-глутамин и 10 % фетальной бычьей сыворотки (PAA Laboratories, Австрия), 0,1 мг/мл стрептомицина, 100 ЕД/мл пенициллина.

Получение экспрессирующих векторов

Для получения бактериального штамма, экспрессирующего рекомбинантный белок YKL-39, его кодирующая последовательность была клонирована в вектор pET45b (+). Кодирующая последовательность YKL-39 человека была амплифицирована на матрице комплементарной ДНК, полученной из матричной РНК клеток линии глиобластомы LN229 с использованием ген-специфических праймеров YKL-39 F3006 XhoI 5'-ACT TCT CGA GAC CAT GGG AGC AAC CAC C и YKL-39 R3006 HindIII 5'-TAG AAA GCT TCA AGG AGC CAA GGC TTC, со встроенными сайтами эндонуклеаз рестрикции XhoI и HindIII соответственно. Амплифицированные фрагменты ДНК очищали и клонировали в вектор pET45b (+) между сайтами XhoI и HindIII. В результате была получена плазмида pET45b-YKL39, несущая кодирующую последовательность гена YKL-39 человека. Отсутствие мутаций в полученной последовательности проверяли при помощи секвенирования.

Экспрессия и очистка рекомбинантного белка

Для экспрессии рекомбинантного белка YKL-39 использовали бактерии *E. coli* штамма BL21DE3. Бактерии, трансформированные плазмидой pET45b-YKL-39, стимулировали IPTG в конечной концентрации 1 мМ в течение 3 ч при 37 °С. Полученные бактерии лизировали с помощью ультразвука, и полученные лизаты использовали для выделения белка.

На I стадии полученные тельца включения экстрагировали 5 М мочевиной в PBST в течение 1 ч при комнатной температуре. На II стадии для лизиса тельца включения был использован буфер следующего состава: 0,5 М аргинина, 6 М мочевины, 20 мМ Трис, pH 10,0, 50 мМ дитиотреитола, 5 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 10 мМ глицина. Лизис осуществляли в течение 12 ч при +4 °С. Полученный лизат центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин и температуре +4 °С. Рефолдинг белков проводили путем перевода гель-фильтрацией на колонке «Сефадекс G-25» в буфер следующего состава: 0,5 М NaCl, 4 М мочевины, 0,5 М аргинина, 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 10 мМ цистеамина, 2 мМ имидазола, PBST – до 50 мл с последующей инкубацией в течение 12–36 ч при +4 °С. Дальнейшую очистку белков производили металл-хелатной хроматографией (IMAC) на колонке IMAC Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare, 17-0921-08). Белок наносили на колонку IMAC Sepharose 6 FastFlow, уравновешенную буфером. Колонку промывали ступенчатым

градиентом концентрации имидазола. Эффективная элюция белка YKL-39 с минимальными примесями происходит при 75 мМ имидазола. Полученный в результате процедуры очистки белок YKL-39 был использован в качестве антигена для иммунизации мышей.

Получение моноклонального антитела

Первичная иммунизация мышей Balb/c (самок 18 г) проводилась путем введения около 30 мкг антигена (рекомбинантный белок YKL-39) с полным адьювантом Фрейнда (1 : 1) в лапы и холку. Бустирование антигеном с неполным адьювантом Фрейнда проводили через 2 нед после первичной иммунизации. Гибридизацию (слияние) спленоцитов мышей с клеточной линией Sp 2/0 делали через 3 дня (на 4-й день) после бустирования с помощью PEG 1500. В среду для посадки гибридом (RPMI-1640 с 15 % Fetal CloneI) добавляли нейтрализующие антитела в соответствии с рекомендациями производителя. Полученные гибридомы были рассажены на три 96-луночных планшета по 150 мкл суспензии в лунку и оставлены на 10 дней, после чего были протестированы методом иммуноферментного анализа.

Иммуноферментный анализ

Рекомбинантный YKL-39 адсорбировали на поверхности лунок 96-луночного планшета в концентрации 5 мкг/мл в течение ночи при +4 °С. Далее лунки промывали 3 раза буфером PBS и блокировали 5 % раствором BSA в PBS в течение 2 ч при 37 °С. Далее планшеты инкубировали с моноклональными антителами. После 3-кратной отмывки раствором PBST проводили инкубацию с пероксидазным конъюгатом антител против мыши (HRPanti-mouse IgG) в разведении 1 : 10000 в течение 1 ч при 37 °С. После 3-кратной отмывки раствором PBST в каждую лунку добавляли 100 мкл субстрата тетраметилбензидина и инкубировали до развития окраски в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением в лунку по 25 мкл 10 % раствора серной кислоты. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 450 нм.

Иммуноблоттинг

Клеточные лизаты получали из субконфлюентного моно слоя клеток с использованием буфера RIPA, содержащего смесь ингибиторов протеаз ($\times 10$ protease cocktail inhibitor, Roche, Швейцария). Концентрацию полученных лизатов определяли методом Бредфорда, на гель наносили 50 мкг белка. Белки разделяли в SDS-полиакриламидном геле, после чего перемещали на нитроцеллюлозную мембрану методом мокрого переноса по стандартному протоколу (прибор Mini Trans-Blot, Bio-Rad Laboratories Inc., США). Мембрану инкубировали в 5 % растворе

обезжиренного молока (Bio-Rad Laboratories Inc., США) в течение 1 ч. Затем ее инкубировали в течение 12 ч со соответствующими первичными антителами при +4 °С с последующей стандартной отмывкой, после чего мембрану инкубировали 1–1,5 ч при комнатной температуре с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. После стандартной отмывки мембрану проявляли с помощью реагента для хемилюминесцентной реакции ECL. Указанную реакцию регистрировали на приборе Kodak Gel Logic 2200 Imaging System с последующей обработкой с помощью программы Kodak Molecular Imaging Software SE ver. 5.0.1.27.

Иммуноцитохимия и иммуноцитофлуоресценция

Культуру LN229 выращивали на покровных стеклах до достижения 30 % конфлюентности. Клетки фиксировали в течение 15 мин в 3,7 % параформальдегида с последующей промывкой в PBS («ПанЭко», Россия). После фиксации и промывок клетки инкубировали с антителом к YKL-39 в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем с козыжими антителами к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с флуорохромом Alexa-488 (Jackson ImmunoResearch, США), или полимерной пероксидазой хрена («Прайм-БиоМед», Россия) 40 или 15 мин соответственно при комнатной температуре. Для визуализации окрашивания в нефлуоресцентном методе добавляли субстрат 3,3-диаминобензидин хромоген на 5–10 мин («Прайм-БиоМед», Россия). Препараты заключали в среду на водной основе и оценивали результаты при помощи микроскопа Olympus BX-53 (Cheminst, Германия), сопряженного с камерой Infinity 2 (Lumenera, США).

Иммуногистохимический анализ

Иммуногистохимическое исследование проводили на операционном материале, фиксированном 10 % нейтральным формалином, забуференным фосфатными солями, в течение 24 ч. После гистологической проводки материал заливали в парафин и затем готовили срезы толщиной 2–4 мкм. Срезы монтировали на специальные высокоадгезивные стекла (SuperFrost Plus, ApexLab) и высушивали в течение 18 ч при 37 °С.

Срезы депарафинизировали ксилолом, регидрировали в спиртах с объемной долей изопропанола 100 (I, II), 70 и 50 % по 5 мин в каждом и промывали в дистиллированной воде. Блокировку эндогенной пероксидазы проводили в 3 % растворе перекиси водорода в течение 10 мин. Срезы инкубировали с антителами к YKL-39, а затем с антителами к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с полимерной пероксидазой хрена. Окрашивание проявляли при помощи субстрата 3,3-диаминобензидин

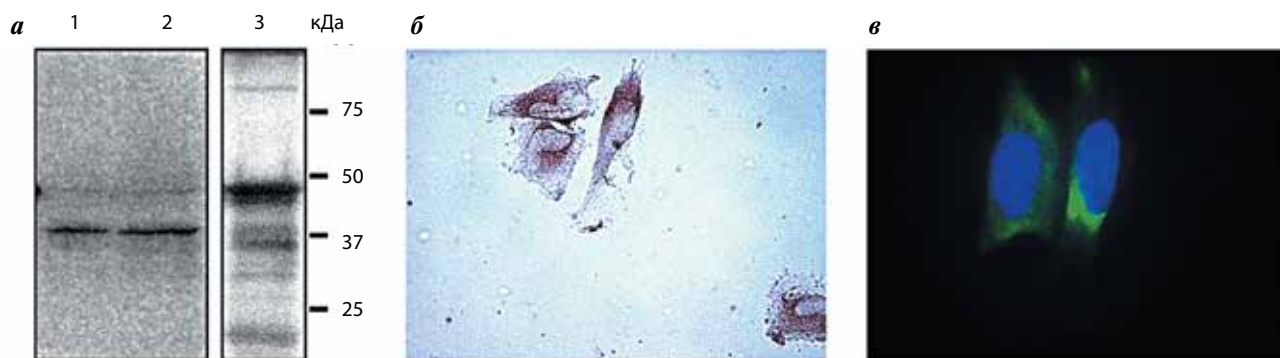


Рис. 1. Иммуноблоттинг тотальных лизатов клеток LN229 (1, 2) и рекомбинантного белка YKL-39 (3). В качестве первых антител были использованы антитела anti-YKL-39 клон 1B2G4 (а). Иммуноцитохимический (б) и иммунофлуоресцентный анализы (в) YKL-39 в клетках LN229 при помощи антител anti-YKL-39 клон 1B2G4 ($\times 40$)

Fig. 1. Immunoblotting of total protein LN229 cell lysates (1, 2) and YKL-39 recombinant protein (3). The anti-YKL-39 clone 1B2G4 antibodies were used as first antibodies (a). Immunocytochemical (b) and immunofluorescent (c) analyses of YKL-39 in LN229 cells using anti-YKL-39 clone 1B2G4 antibodies ($\times 40$)

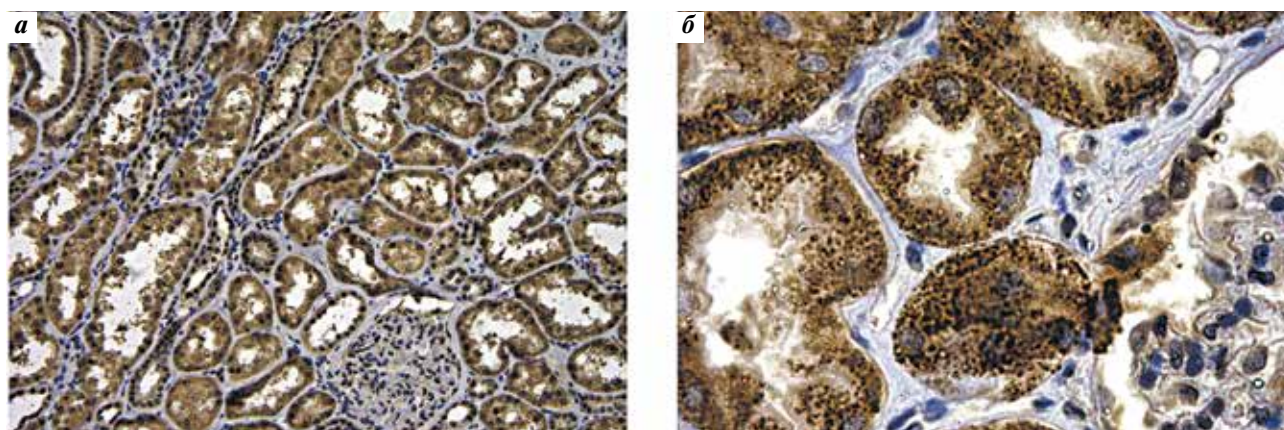


Рис. 2. Иммуногистохимический анализ YKL-39 в парафиновых срезах здоровой почки. Окрашивание проводили при помощи антител anti-YKL-39 клон 1B2G4. Специфическая гранулярная окраска цитоплазмы клеток канальцев на парафиновом срезе ткани, фиксированном формалином, свидетельствует о наличии клеток, экспрессирующих YKL-39. $\times 100$ (а) и $\times 400$ (б)

Fig. 2. Immunocytochemical analysis of YKL-39 in paraffin sections of a healthy kidney. The sample was stained with anti-YKL-39 clone 1B2G4 antibodies. Specific granular staining of the cytoplasm of the renal tubules fixed with formalin indicates presence of cells expressing YKL-39. $\times 100$ (a) and $\times 400$ (b)

хромогена в течение 5–10 мин. Результаты оценивали с помощью микроскопа Olympus BX-53 (Cheminst, Германия).

Результаты

Для разработки новых моноклональных антител к ХПБ YKL-39 в качестве иммуногена был использован полноразмерный рекомбинантный белок. В результате иммунизации был получен 21 клон гибридом, производящих антитела, связывающиеся с антигеном.

В результате дальнейшего клонирования и анализа кросс-реактивности с другими ХПБ был отобран 1 клон 1B2G4, взаимодействующий при иммуноферментном анализе с YKL-39 и не взаимодействующий с его ближайшими гомологами YKL-40 и SI-CLP (данные не показаны).

Для подтверждения специфичности антител дополнительно был проведен анализ белка YKL-39

методом иммуноблоттинга в тотальных лизатах клеток глиобластомы LN229, в качестве контроля был использован рекомбинантный белок, выделенный из *E. coli* (рис. 1а). Было показано, что в клеточных лизатах LN229 антитела 1B2G4 узнают 2 изоформы белка размерами 39 и 48 кДа (см. рис. 1а), что характерно для ХПБ [8, 9]. Далее полученные антитела 1B2G4 тестировали методом иммуноцитохимии и иммунофлуоресценции, после чего анализ клеток LN229 выявил окрашивание цитоплазматических гранул, характерных для секретируемых белков (рис. 1б, в).

Антитела к белку YKL-39, клон 1B2G4 тестировали методом иммуногистохимии на парафиновых срезах нормальной почки. Температурную демаскировку антигена проводили в цитратном буфере pH 6,0, окрашивание срезов – по стандартному протоколу. Полученные результаты представлены на рис. 2. Наблюдается четкая цитоплазматическая окраска

клеток эпителия почечных канальцев, характерная для окрашивания антителами к YKL-39 [10].

Заключение

Таким образом, антитела, продуцируемые гибридомой YKL-39, клон 1B2G4 специфически работают

в иммуноферментном анализе, иммуноцитохимии, непрямой иммунофлуоресценции, иммуноблоттинге на тотальных лизатах клеточной линии LN229 и рекомбинантном белке, иммуногистохимии на тканях почки. Антитела связываются с полноразмерным белком YKL-39 и не взаимодействуют с другими ХПБ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Gratchev A., Schmuttermayer C., Mamidi S. et al. Expression of Osteoarthritis Marker YKL-39 is Stimulated by Transforming Growth Factor Beta (TGF-beta) and IL-4 in Differentiating Macrophages. *Biomark Insights* 2008;3:39–44.
2. Hu B., Trinh K., Figueira W.F. et al. Isolation and sequence of a novel human chondrocyte protein related to mammalian members of the chitinase protein family. *J Biol Chem* 1996;271(32):19415–20.
3. Steck E., Breit S., Breusch S.J. et al. Enhanced expression of the human chitinase 3-like 2 gene (YKL-39) but not chitinase 3-like 1 gene (YKL-40) in osteoarthritic cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299(1):109–15.
4. Knorr T., Obermayr F., Bartnik E. et al. YKL-39(chitinase 3-like protein 2), but not YKL-40(chitinase 3-like protein 1), is up regulated in osteoarthritic chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2003;62(10):995–8.
5. Colton C.A., Mott R.T., Sharpe H. et al. Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *J Neuro-inflammation* 2006;3:27. DOI: 10.1186/1742-2094-3-27.
6. Miyatake K., Tsuji K., Yamaga M. et al. Human YKL39 (chitinase 3-like protein 2), an osteoarthritis-associated gene, enhances proliferation and type II collagen expression in ATDC5 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;431(1):52–7. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.094.
7. Liu T., Larionova I., Litviakov N. et al. Tumor-associated macrophages in human breast cancer produce new monocyte attracting and pro-angiogenic factor YKL-39 indicative for increased metastasis after neoadjuvant chemotherapy. *Oncoimmunology* 2018;7(6):e1436922. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1436922.
8. Kzhyshkowska J., Mamidi S., Gratchev A. et al. Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway. *Blood* 2006;107(8):3221–8. DOI: 10.1182/blood-2005-07-2843.
9. Renkema G.H., Boot R.G., Au F.L. et al. Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem* 1998;251(1–2):504–9.
10. Uhlen M., Fagerberg L., Hallstrom B.M. et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015;347(6220):1260419. DOI: 10.1126/science.1260419.

Вклад авторов

А.Н. Грачев: разработка дизайна и планирование работы, написание статьи;
Д.В. Самойлова, С.Н. Курочкин: получение данных;
О.В. Ковалева: получение и анализ данных, написание статьи.

Authors' contributions

A.N. Grachev: study design and planning, manuscript preparation;
D.V. Samoylova, S.N. Kurochkin: data accumulation;
O.V. Kovalyova: receipt and analysis and manuscript preparation.

ORCID авторов/ORCID of authors

А.Н. Грачев/A.N. Grachev: <https://orcid.org/0000-0003-2137-1866>
О.В. Ковалева/O.V. Kovaleva: <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>
Д.В. Самойлова/D.V. Samoilova: <https://orcid.org/0000-0001-5639-0835>
С.Н. Курочкин/S.N. Kurochkin: <https://orcid.org/0000-0002-8043-3871>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-04-01857), фонда развития Центра разработки и коммерциализации новых технологий «Сколково».

Financing. The study was performed with the support from the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 17-04-01857), Foundation for Development of the New Technologies Development and Commercialization Center “Skolkovo”.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 24.10.2018. **Принята в печать:** 12.04.2019.

Article received: 24.10.2018. **Accepted for publication:** 12.04.2019.