

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.21.088:616-006-018:577.112

Н.А. Лыжко^{1,2}, Т.В. Ахлынина^{1,2}, А.В. Мисюрин^{1,2}, Ю.П. Финашутина^{1,2}, Е.В. Аксенова^{1,2},
И.Н. Солдатова^{1,2}, В.А. Мисюрин^{1,2}, А.Ю. Барышников¹

ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *PRAME*

В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ СОПРОВОЖДАЕТСЯ ЛОКАЛИЗАЦИЕЙ БЕЛКА В КЛЕТОЧНОМ ЯДРЕ

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

²ООО «ГеноТехнология», Москва

Контактная информация

Всеволод Андреевич Мисюрин, к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной химиотерапии НИИ ЭДнТО

адрес: 115478 Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(499)324-02-00

e-mail: vsevolod.misyurin@gmail.com

Статья поступила 28.08.2015, принята к печати 27.11.2015.

Резюме

Вопрос о локализации белка *PRAME* в опухолевой клетке до сих пор не разрешён. Мы создали два антитела, специфично распознающие эпитопы *PRAME*, и с их помощью проверили локализацию данного белка в клетках линий K562 и *mel Kor*, изначально имеющих высокий уровень экспрессии гена *PRAME*, в клетках линий B16F10 и WI-38, трансфицированных данным геном, и исходных линий, а также в клетках, выделенных из костного мозга больных острыми лейкозами. Мы показали, что в клетках с высоким уровнем экспрессии *PRAME* наблюдается локализация белка как в ядре, так в цитоплазме и на клеточной мембране. При более низком уровне экспрессии данного гена локализация белка чаще наблюдалась в цитоплазме и на клеточной мембране. Более того, разработанные антитела при инкубации с клетками, экспрессирующими *PRAME*, продемонстрировали цитостатический эффект.

Ключевые слова: экспрессия гена *PRAME*, локализация в клетке, белок *PRAME*.

N.A. Lyzhko^{1,2}, A.V. Misyurin^{1,2}, T.V. Ahlynina^{1,2}, Y.P. Finashutina^{1,2}, E.V. Aksenova^{1,2},
I.N. Soldatova^{1,2}, V.A. Misyurin^{1,2}, A.Yu. Baryshnikov¹

PRAME PROTEIN ARE LOCATED

IN CELL NUCLEUS DURING ITS GENE

IS HYPEREXPRESSED

¹FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow

²«GeneTechnology» LLC, Moscow

Abstract

The problem on the localization of the protein *PRAME* in cancer cell remains unclear. We have created two antibodies, that specifically recognize *PRAME* epitopes. Using them, we have checked the localization of *PRAME* protein in some cell lines, including K562 and *mel Kor*, that characterized by high *PRAME* gene expression level, original lines B16F10 and WI-38, and B16F10 and WI-38, that transfected by *PRAME* gene. Finally, we have investigated the *PRAME* localization in acute myeloid leukemia patient's bone marrow cells. We have shown, the *PRAME* protein are localised in nucleus, cytoplasm and plasma membrane of cells with high *PRAME* gene expression levels. *PRAME* protein localisation only in cytoplasm and plasma membrane in cells with lower gene expression level. Moreover, our antibodies demonstrated cytotoxic effect during co-incubation with *PRAME*⁺ cells.

Key words: *PRAME* gene expression, localization, protein *PRAME*.

Введение

Антиген *PRAME*, экспрессируемый преимущественно при меланоме, был определен как опу-

холевый антиген, распознаваемый аутологичными опухолюспецифическими цитотоксическими Т-лимфоцитами больных меланомой [20]. Белок *PRAME* относится к группе РТА, и его паттерн экс-

прессии характерен для многих представителей этой группы [5]. Масса белка составляет 58 кДа, в состав входит 509 аминокислотных остатков. Ген *PRAME* локализован на 22 хромосоме [26; 34]. Зрелый белок *PRAME* блокирует передачу сигналов ретиноевой кислоты [20]. Так, *PRAME* ингибирует дифференцировку миелоидных клеток, зависящую от ретиноевой кислоты. Однако *PRAME*-опосредованное ингибирование дифференцировки некоторых типов гемопоэтических стволовых клеток не связано с метаболизмом ретиноевой кислоты [25]. Кроме того, предполагается, что *PRAME* участвует в регуляции процессов передачи апоптотического сигнала [13; 15].

Большинство нормальных тканей не экспрессирует *PRAME*, но активность гена на небольшом уровне характерна для сперматоцитов, клеток плаценты, эндометрия, яичников и надпочечников. Однако белок часто экспрессируется при онкологических заболеваниях, таких как меланома (88 % первичных очагов), НМРЛ, РМЖ, карцинома почки, ММ и ЛГМ [1; 4; 18; 22; 23]. *PRAME* также экспрессируется у 17–42 % больных острыми лимфолейкозами и у 30–64 % больных ОМЛ, а также при ХМЛ [7; 31]. Уровень экспрессии *PRAME* при бластном кризе ХМЛ в основном намного выше по сравнению с хронической фазой заболевания [34]. В большинстве случаев гиперэкспрессия *PRAME* является маркером плохого прогноза, метастазирования и снижения ОВ, например, у больных РМЖ. С другой стороны, высокий уровень экспрессии *PRAME* при ОМЛ у детей и остром промиелоцитарном лейкозе у взрослых является маркером благоприятного прогноза и связан с увеличением продолжительности жизни и большим временем до развития рецидива [6; 20]. Учитывая именно эту опухолевую экспрессию, некоторые авторы предположили, что *PRAME* может быть использован как мишень для мониторинга МОБ при острых лейкозах [31].

Поскольку уже известно, что продукты экспрессии *PRAME* могут служить маркером МОБ и быть мишенью для иммунотерапии, вопрос о локализации белка в клетке и возможной связи с уровнем экспрессии *PRAME* представился нам интересным для исследования. Известно, что экспрессия большинства РТА на уровне белков в основном происходит в ядре. Ранее в нескольких лабораториях уже определяли внутриклеточную локализацию белка *PRAME*, но полученные результаты обычно не совпадали [27; 33; 34].

Так, в работе Tajeddine et al. локализацию белка *PRAME* определяли как ядерную и перинуклеарную. Wadelin et al. обнаружили в основном ядерную и цитоплазматическую локализацию. В работе Proto-Siqueira et al. локализация *PRAME* определена как цитоплазматическая и мембранная. Как видно, полученные результаты противоречат друг другу, поэтому вопрос об истинной локализации белка *PRAME* в клетке остался открытым.

Учитывая, что одно антитело распознаёт единственный эпитоп антигена, мы предположили,

что применение МКА к разным антигенным детерминантам белка *PRAME* позволит выявить больше его эпитопов и точнее определить его локализацию в клетке.

Материалы и методы

Работа с клеточными линиями

В работе использовали клетки эритромиелоидного лейкоза K562, эмбриональные легочные фибробласты человека WI-38, клетки меланомы человека *mel Kor* и клетки меланомы мыши B16F10. Культуры клеток инкубировали при +37 °C в CO₂-инкубаторе на среде RPMI-1640, содержащей 2 mM глутамин, 10 mM HEPES, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 40 мкг/мл гентамицина сульфата. Клетки WI-38, B16F10 и *mel Kor* пересеивали при достижении конfluence монослоя с помощью 0,02 %-ного р-ра Версена и 0,25 %-ного р-ра трипсина.

Изготовление экспрессирующих векторов и трансфекция

За сутки до трансфекции клетки фибробластов WI-38 сеяли по $3,2 \times 10^6$ в культуральные флаконы (25 см³). Трансфекцию с плазмидами pCEP4 и pCEP4-*PRAME* проводили по инструкции к препарату TransFast Transfection Reagent в среде без сыворотки. Через 48 часов после постановки реакции к клеткам добавляли селективный антибиотик гиромидин В по 30 мкг/мл. После трансфекции в полученных линиях B16F10-pCEP4, B16F10-pCEP4-*PRAME*, WI-38-pCEP4 и WI-38-pCEP4-*PRAME* определяли экспрессию гена *PRAME*. За сутки до трансфекции клетки B16F10 сеяли по $1,3 \times 10^6$ в культуральные флаконы (25 см³). Постановку реакции трансфекции с плазмидами pCEP4 и pCEP4-*PRAME* проводили по инструкции производителя, прилагаемой к препарату Metafectene Pro. Трансфекцию проводили в среде с сывороткой. Через 48 часов после постановки реакции к клеткам добавляли селективный антибиотик гиромидин В по 30 мкг/мл среды.

Валидация экспрессии гена *PRAME*

Выделение РНК проводилось гуанидин тиоционат хлороформ-фенольным методом из суспензий клеточных культур, а также из клеток острого мозга и периферической крови больных острыми лейкозами (не М3-вариант) [12]. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора случайных нуклеотидных гексамеров в качестве праймеров и обратной транскриптазы M-MLV (Fermentas, США).

Количественное определение экспрессии гена *PRAME* в культурах клеток, а также клетках острого мозга больных острыми лейкозами, проводилось методом ПЦР в реальном времени по технологии TaqMan с использованием специфических праймеров и флуоресцентных зондов на приборе IQ Cycler (BioRad, США). Флуоресцентный сигнал определяли при 60 °C с использованием фильтров

для FAM. В качестве контрольного гена использовали *Abl*. В качестве положительных контролей (стандартов) использовали разведения плазмид с известным числом копий, с вставкой участка соответствующего гена. На одноканальном секвенаторе ABIPrizm 310 определили специфичность прошедшей реакции ПЦР (Applied Biosystems, США).

Получение МКА

Мышей линии Balb/c трехкратно с двухнедельными интервалами иммунизировали очищенным белком PRAME в дозе 50 мкг/мышь. Получение белка проводили по разработанной нами методике [9] Слияние клеток селезенки мышей с миеломными клетками и дальнейшее субклонирование гибридом проводили согласно стандартным методикам [10]. Последующий отбор гибридомных клонов проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа согласно стандартным методикам, используя белок PRAME. Дополнительный отбор гибридом, секретирующих антитела проводили методом Вестерн-блоттинга, используя линию клеток K562 с высоким уровнем экспрессии PRAME. Были получены две гибридомные линии, секретирующие МКА 5D3F2 и 6H8F12. В дальнейшем МКА получали из асцитной жидкости мышей, имеющих в брюшной полости клетки соответственной гибридомы; при этом иммуноглобулиновую фракцию получали высаливанием белков сульфатом аммония с последующим диализом.

Валидация экспрессии белка PRAME

Экспрессию белка определяли в лизатах клеточных линий K562, *mel Kor* и фибробластах человека WI-38. Лизаты приготавливали с помощью RIPA-буфера с ингибиторами протеаз (Thermo Scientific Pierce, USA). Электрофорез в 10 %-ном полиакриламидном геле проводили согласно стандартной методике U.K. Laemmli. После электрофореза методом полусухого электроблоттинга осуществляли перенос белков из геля на Amersham Hybond-P PVDF мембрану (GE Healthcare, Великобритания), предварительно смоченную буфером для электропереноса. В качестве первичных антител использовали полученные в данной работе МКА к белку PRAME; вторичных – антитела козы против антител мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (1 : 10000, Immune Jackson Research, США). Для визуализации белка, связавшегося с антителами, использовали двухкомпонентную ECL™ Western Blotting систему (GE Healthcare, Великобритания) и экспонировали мембраны с использованием пленки Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Великобритания).

Определение локализации белка внутри клеток

Локализация белка PRAME определялась с помощью иммунофлуоресцентного анализа, используя мышиные МКА к белку PRAME и вторичные флуоресцентные антимышиные антитела. Монослойные культуры клеток инкубировали в 24-

или 96-луночных планшетах. Клетки промывали PBS и добавляли 20 мкл раствора анти-PRAME МКА (гибридомные линии 5D3F2, 6H8F12, разведение 1 : 10; 1 : 20; 1 : 50 или 1 : 100). В контрольную пробу добавляли 1 %-ный раствор БСА в PBS. Клетки инкубировали с МКА 2 ч в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением PBS и два раза клетки промывали PBS. Затем добавляли по 20 мкл раствора флуоресцентных вторичных антител Alexa Flour 488 goat-antimouse IgG (H+L) с концентрацией 5–10 мкг/мл, инкубировали в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре.

После инкубации клетки два раза промывали раствором PBS, а затем инкубировали 15 мин с 2 мкг/мл раствора Хёхста 33342 в темноте при комнатной температуре. Клетки два раза промывали PBS. Локализацию флуоресценции в клетках определяли с помощью микроскопа Karl Zeiss Axiovert 40CFL, возбуждая и регистрируя зеленую флуоресценцию для Alexa Flour 488 при длинах волн 495 и 520 нм соответственно, голубую флуоресценцию Хёхста 33342 при 350 и 460 нм соответственно.

Для приготовления фиксированных препаратов клеток K562 на предметном стекле отбирали по 2×10^6 клеток. Клетки суспендировали в ЭТС и делали мазок на стекле, препарат сушили на воздухе, фиксировали этиловым спиртом в течение 5 мин или сначала этиловым спиртом 5 мин, затем ацетоном в течение 2 мин при температуре -20°C . Клетки на предметном стекле промывали раствором PBS два раза, после этого инкубировали в течение 30 мин с раствором 0,5 %-ного тритона X-100 при температуре $+4^\circ\text{C}$. Промывали PBS 3 раза, инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте с 1 %-ным БСА в PBS и, не промывая, наносили раствор МКА (5D3F2 или 6H8F12, разведениях 1 : 10; 1 : 20; 1 : 50 или 1 : 100), инкубировали 2 ч в темноте при комнатной температуре во влажной камере. В контрольную пробу добавляли раствор 1 %-ного БСА в PBS. После окончания инкубации клетки два раза промывали PBS. Затем все препараты инкубировали с Alexa Flour 488 goat antimouse IgG (H+L) в концентрации 5-10 мкг/мл при комнатной температуре в течение 1 ч. После окончания инкубации с вторичными антителами препараты промывали два раза PBS, затем инкубировали в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре с раствором Хёхста 10 мкг/мл. После этого клетки два раза промывали PBS и оценивали их флуоресценцию.

Монослойные культуры клеток WI-38, WI-38-pCEP4-PRAME, *mel Kor*, B16F10, B16F10-pCEP4, B16F10-pCEP4-PRAME были посеяны по 2×10^4 /луночку 24-луночной платы. На следующий день клетки фиксировали этиловым спиртом и проводили инкубации с МКА так же, как и фиксированные препараты клеток K562 Хьюстон. В отдельных случаях клетки обрабатывали раствором TBSTB (0,5 %-ный р-р Тритона X-100, 10 %-ная ЭТС в PBS). Его использовали для разведения первичных МКА, а также для отмывки клеток после их инкубации с антителами.

Клетки B16F10-pCER4-PRAME были посеяны по 2×10^4 в 24-луночную плату в среде RPMI-1640, содержащей 2 мМ глутамин, 10 мМ HEPES, 10 %-ную ЭТС, 40 мкг/мл гентамицина сульфата. На следующий день меняли среду с добавлением либо 5 %-ной мышиной сыворотки от контрольных мышей или от мышей, иммунизированных белком PRAME, либо смеси 5 %-ной сыворотки от мышей, иммунизированных белком PRAME, с добавлением МКА 5D3F2 до 5 %. Эффект действия сывороток и МКА оценивали через сутки инкубации. Число живых и мертвых клеток определяли с помощью трипанового синего.

Результаты

Специфичность полученных МКА к белку PRAME

Были получены две гибридные линии, секретирующие МКА 5D3F2 и 6H8F12 к белку PRAME. МКА специфически распознавали как очищенный рекомбинантный PRAME, так и белок, экспрессирующийся в культурах клеток.

Проверку функциональности полученного экспрессионного вектора pCER4-PRAME проводили по следующей схеме: фибробласты WI-38 были транзитивно трансфицированы этой плазмидой, и наличие рекомбинантного белка подтверждали методом Вестерн-блот анализа, результаты которого представлены на рис. 1. Полученные МКА специфически связывались с белком с молекулярной массой ~60 кДа, что было выявлено при иммуноблоттинге. Белок распознавался в лизатах клеток, имеющих высокий прижизненный уровень экспрессии гена PRAME.

Локализация белка PRAME в опухолевых культурах клеток

В клетках mel Kor (имеющих высокий уровень экспрессии PRAME (табл.) выявили локализацию PRAME преимущественно в ядре (66,5 %), в цитоплазме (28,5 %) и на поверхности клеток (5 %). При изучении кинетики связывания МКА 5D3F2 (1 : 100) с фиксированными клетками mel Kor было показано, что при увеличении времени инкубации с 30 до 120 мин усиливался внутриклеточный сигнал флуоресценции, и особенно – сигнал в ядрах клеток (рис. 2).

В клетках линии K562 уровень экспрессии PRAME был очень высоким (табл.). На фиксированных клетках K562 было показано, что полученные 2 типа МКА 5D3F2 и 6H8F12 имеют в этих клетках разные сайты связывания. При использовании МКА 5D3F2 (при разведении 1 : 100) флуоресценция локализовалась в основном внутри клеток – в ядре (51 %), в перинуклеарном пространстве и в цитоплазме (49 %; рис. 3, А, Д, И). При тех же условиях инкубации МКА 6H8F12 флуоресценция была обнаружена на клеточной поверхности K562 (рис. 3, В, Ж).

Для сравнения были использованы две клеточные линии, которые не экспрессируют PRAME –

фибробласты человека WI-38 и клетки меланомы мыши B16F10. В клетках исходной линии WI-38 при инкубации с МКА 5D3F2 не было обнаружено флуоресценции (рис 4, А, В, Д). После трансфекции уровень экспрессии гена PRAME в клетках WI-38-pCER4-PRAME был сопоставим с уровнем, наблюдаемым в клетках mel Kor и K562 (табл.). Уровень флуоресцентного сигнала для белка PRAME в этих клетках был высок так же, как и в клетках с исходно высоким уровнем экспрессии гена PRAME, и также выявлена внутриклеточная локализация белка. В клетках WI-38-pCER4-PRAME при наибольшем разведении МКА 5D3F2 флуоресценция наблюдалась в основном в ядре и цитоплазме (рис 4, Ж, И, Л) так же, как и для клеток K562. Ядерная локализация белка при использовании разведения МКА 1 : 100 наблюдалась во вдвое большем числе клеток, чем при разведении антител 1 : 50 (рис 4, И, Л).

Сопоставив результаты, полученные после применения различных концентраций МКА, мы предположили, что антитела в высокой концентрации, связавшись с фиксированными клетками, в основном остаются на их поверхности, так как забивают все возможные поры во внешней мембране. При меньшей концентрации антитела с большей лёгкостью проникают внутрь клетки, и равномерно связываются с эпитопами. В дальнейшем при определении локализации PRAME мы использовали наибольшее разведение первичных МКА (1 : 100) и наибольшее время инкубации с ними (2 ч).

В клетках меланомы мыши B16F10, трансфицированных контрольной плазмидой pCER4, не наблюдалось активности гена PRAME, и при инкубации с МКА флуоресценции не было обнаружено.

В клетках B16F10-pCER4-PRAME уровень экспрессии PRAME был ниже, флуоресценция – слабее, число клеток с ядерной локализацией – ниже, чем в клетках mel Kor, K562 и WI-38-pCER4-PRAME (табл.).

На живых клетках B16F10-pCER4-PRAME, имеющих высокий уровень экспрессии гена PRAME, флуоресценция с МКА 5D3F2 и 6H8F12 была слабой и кластеризованной, на поверхности клеток были видны отдельные светящиеся точки.

Локализация белка PRAME в клетках костного мозга больных

В серии проведенных экспериментов выяснили, в каких компартментах клетки больного распределяется белок PRAME в зависимости от уровня экспрессии гена PRAME. Согласно результатам анализа уровня экспрессии PRAME все больные были разделены на две группы (группы пациентов с относительно высоким и низким уровнем экспрессии этого гена). При проведении иммунофлуоресцентного анализа были получены следующие данные:

в группе пациентов с высоким уровнем экспрессии PRAME (0,587–6,3 % PRAME/AbI) белок локализовался как внутри клеток (33,3 % в ядре и 23,3 % в цитоплазме), так и на клеточной поверхности (43,3 %).

Таблица

Выявление МКА 5D3F2 и 6H8F12 локализации белка PRAME в различных клетках

Клетки	Фиксация клеток	Обработка TBSTB	Антитело 5D3F2			Антитело 6H8F12			Интенсивность флуоресценции	Уровень экспрессии гена PRAME*
			Локализация, выявленная антителом в клеточных компартментах, %			Локализация, выявленная антителом в клеточных компартментах, %				
			Ядро	Цитоплазма	Внешняя мембрана	Ядро	Цитоплазма	Внешняя мембрана		
mel Kor	+	–	54	54	10	Н/Д*	Н/Д	Н/Д	++	568%
mel Kor	+	+	88	12	0	Н/Д	Н/Д	Н/Д	++	568%
mel Kor	–	–	0	0	40	Н/Д	Н/Д	Н/Д	±	568%
K562	+	–	51	49	0	0	0	100	++	541%
WI-38	+	+	0	0	0	0	0	0	–	0,0013%
WI-38-pCEP4-PRAME	+	+	80	20	0	Н/Д	Н/Д	Н/Д	++	542%
B16F10-pCEP4	+	–	0	0	0	Н/Д	Н/Д	Н/Д	–	0%
B16F10-pCEP4-PRAME	+	–	20	80	0	Н/Д	Н/Д	Н/Д	+	373%
Клетки больного	+	–	0	29	71	0	4	96	±	1,18%
Клетки больного	+	–	100	0	0	100	0	0	+	1,75%
Клетки больного	+	–	0	40	60	0	67	33	+	3,33%
Клетки больного	+	–	0	0	0	0	0	0	–	0,0059%
Клетки больного	+	–	0	88	12	0	47	53	+	0,0037%
Клетки больного	+	–	0	34	66	0	34	66	++	0,0073%
Клетки больного	+	–	0	0	0	0	0	0	–	0%
Клетки больного	+	–	0	33	67	0	36,9	34,6	+	0%

*Уровень экспрессии гена PRAME был рассчитан в процентах относительно гена Abl.

** Н/Д – эксперимент не проводился.

Фиксация клеток: «+» – клетки были фиксированы, «–» – живые клетки. Обработка TBSTB: «+» – проводилась, «–» – не проводилась. Интенсивность флуоресценции: «+++» – оценивалась как очень высокая, «++» – высокая, «+» – низкая, «–» – отсутствует.

В группе пациентов с низким уровнем экспрессии гена PRAME ($0-5,87 \times 10^{-3}$ PRAME/Abl) белок PRAME был обнаружен в основном в цитоплазме (36,9 %) и, в большинстве случаев, на поверхности клеток (34,6 %). В некоторых случаях (28,5 %) белок PRAME обнаружен не был (табл.).

**Цитостатическое воздействие
моноклональных антител на клетки,
экспрессирующие PRAME**

Как показано выше, полученные нами МКА можно использовать для определения локализации белка.

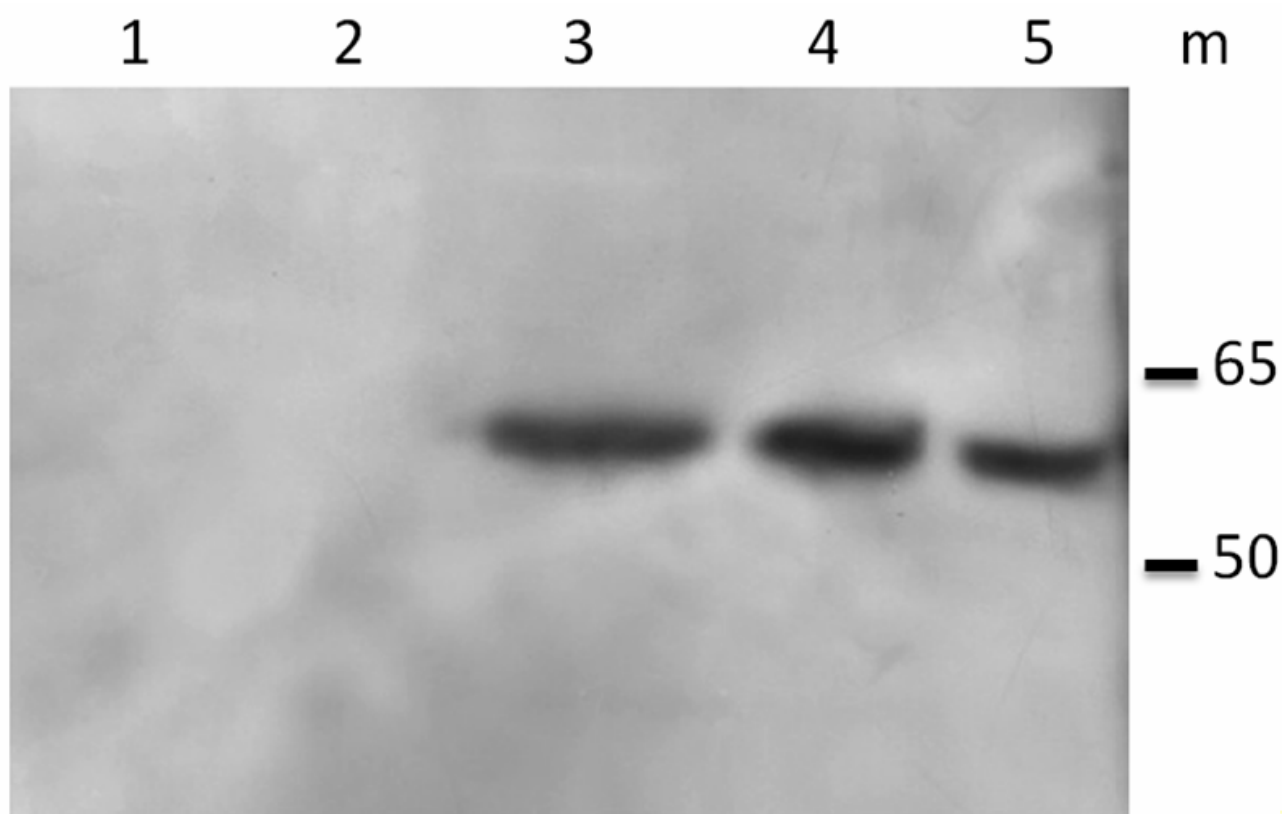


Рис.1. Экспрессия белка PRAME в различных культурах клеток, выявляемая с помощью МКА 6H8F12:

- 1 – исходные фибробласты WI-38;
- 2 – фибробласты, трансфицированные контрольным вектором pCER4;
- 3 – фибробласты, трансфицированные вектором pCER4-PRAME;
- 4 – клетки K562;
- 5 – очищенный рекомбинантный белок PRAME;
- m – маркер молекулярных масс

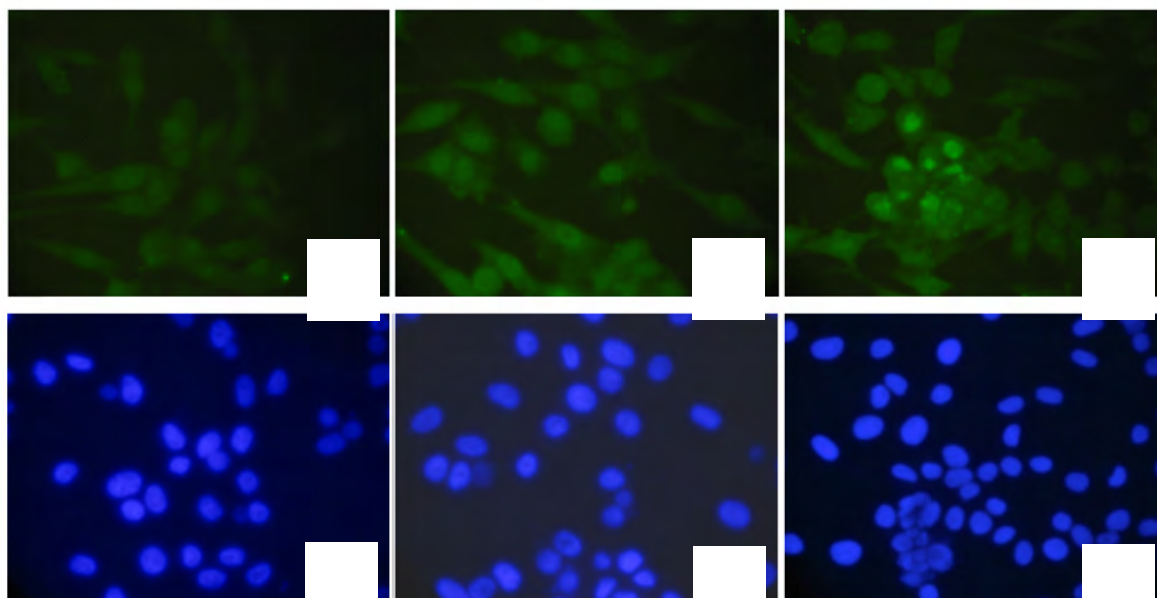


Рис. 2. Кинетика связывания МКА 5D3F2 в разведении 1 : 100 с белком PRAME в фиксированных клетках *mel Kor*. Время инкубации клеток с МКА 5D3F2: 30 мин (А), 60 мин (Б) и 120 мин (В), и окраска вторичными анти-телами; Г, Д и Е – окраска Хёхстом препаратов А, Б и В, соответственно.

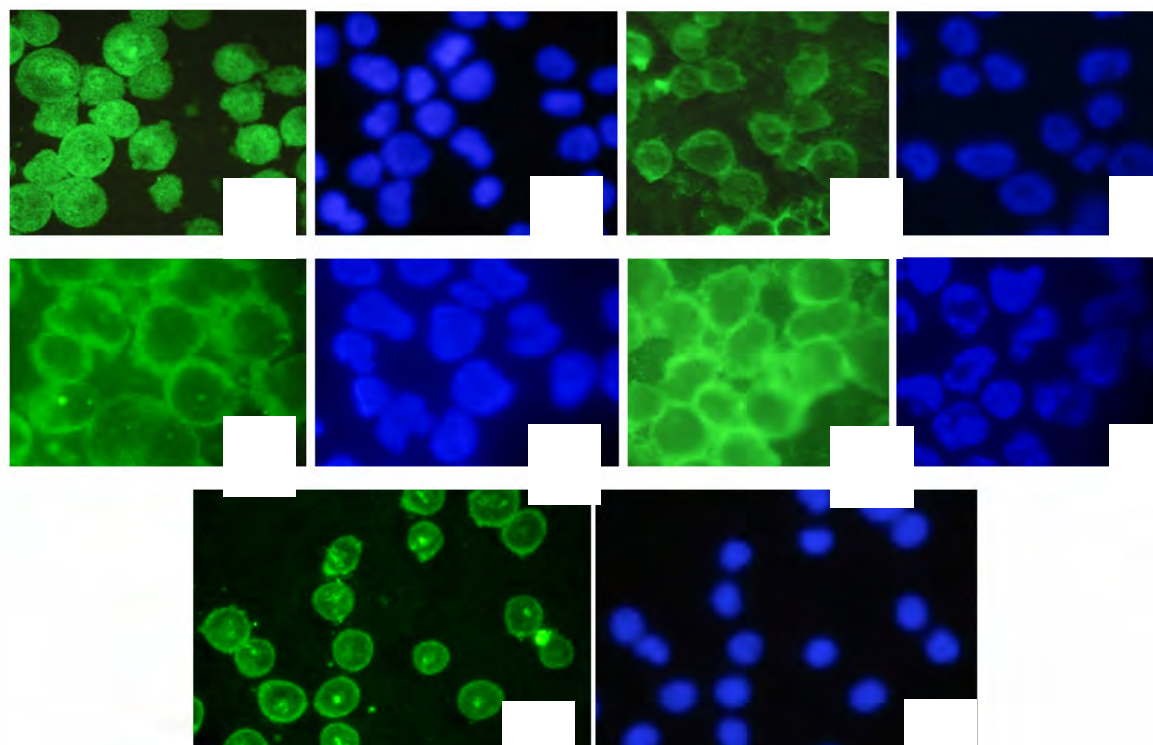


Рис. 3. Локализация белка *PRAME* в клетках K562. Фиксированные клетки K562 инкубировали 2 ч. с МКА 5D3F2 (А, Б, Д, Е, И, К) и 6H8F12 (В, Г, Ж, З) в разведениях 1 : 100 (А, Б, В, Г), 1 : 50 (Д, Е, Ж, З), 1 : 10 (И, К). Те же препараты, окрашенные Хёхстом (Б, Г, Е, З, К). Увеличение 400× – А-Г, И, К, 1000× – Д-З.

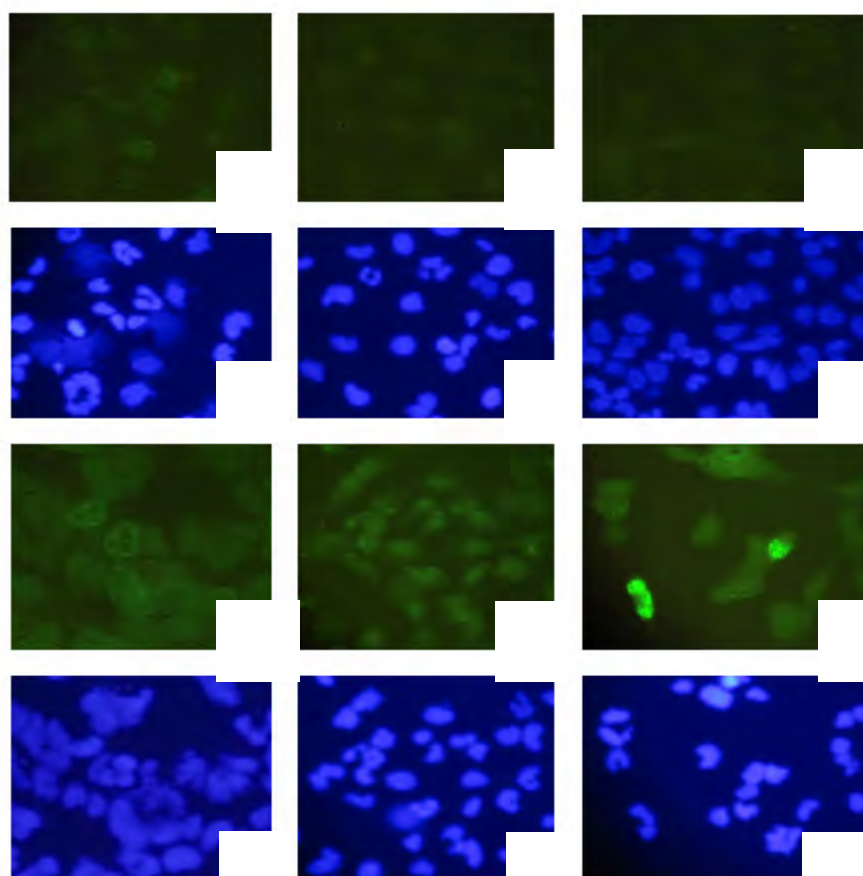


Рис. 4. Инкубация фиксированных клеток WI-38 и WI-38-pCER с МКА 5D3F2: А, Б, Ж, З – клетки WI-38, Ж-М – WI-38-pCER4-PRAME. А, Б, Ж, З – МКА 5D3F2 в разведении 1 : 20; В, Г, И, К – МКА 5D3F2 в разведении 1 : 50; Д, Е, Л, М – МКА 5D3F2 в разведении 1 : 100. Б, Г, Е, З, К, М – окраска ядер Хёхстом.

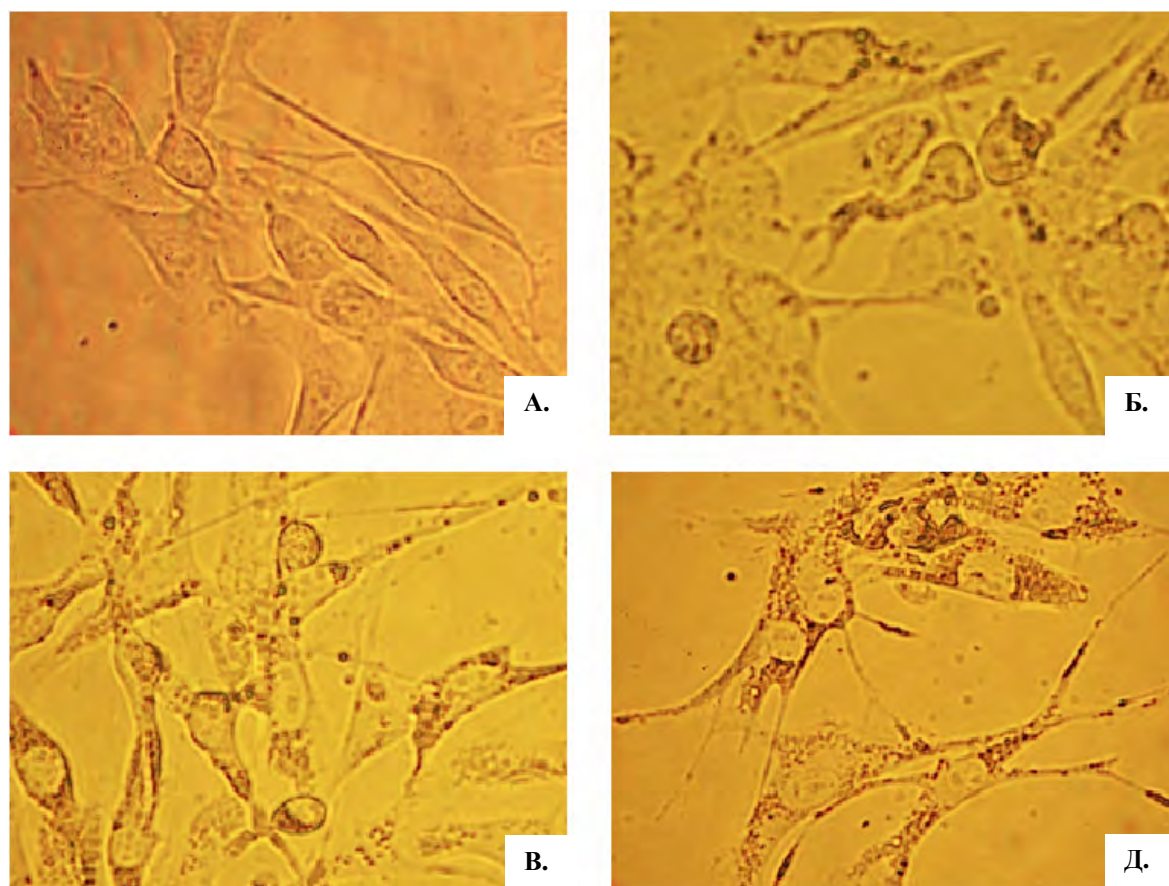


Рис. 5. Влияние МКА и сывороток крови мышей на рост клеток B16F10-pCER4-PRAME после суток инкубации при различных условиях: А – клетки инкубированы с 10 %-ной ЭТС; Б – клетки инкубированы с 10 % сыворотки крови неиммунизированных мышей; В – клетки инкубированы с 10 % сыворотки крови мышей, иммунизированных PRAME, Г – клетки инкубированы с МКА 5D3F2 и с 5 % сыворотки крови мышей, иммунизированных PRAME.

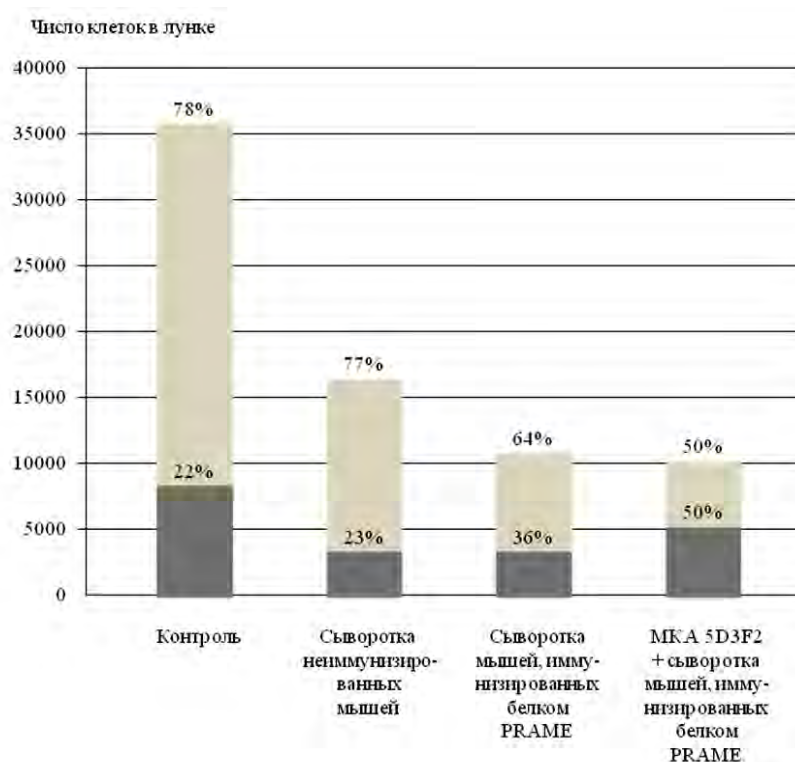


Рис. 6. Влияние сывороток мышей и МКА 5D3F2 на рост клеток B16F10-pCER4-PRAME.

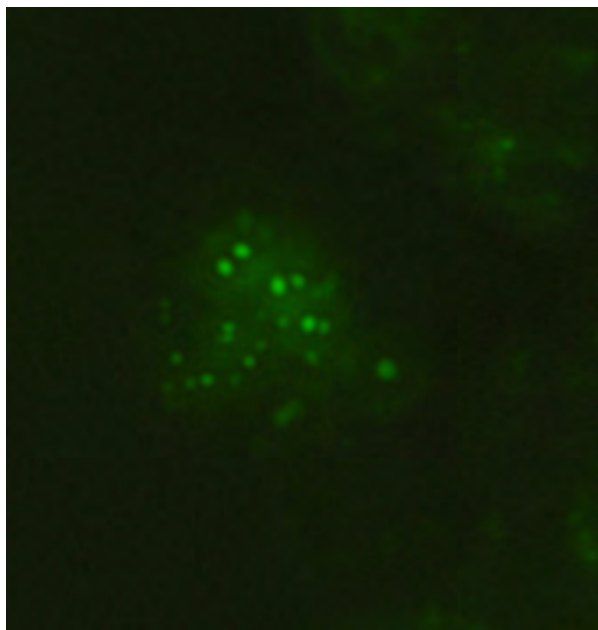


Рис. 7. Локализация белка в клетках линии *mel Kor*

Кроме того, мы решили исследовать воздействие этих МКА на живые клетки, экспрессирующие *PRAME*. В данном эксперименте использовались сыворотки крови контрольных мышей; мышей, иммунизированных белком *PRAME*, полученным ранее [23] и МКА 5D3F2. Было показано, что после 24 ч инкубации рост клеток B16F10-pCER4-*PRAME* в присутствии сыворотки крови неиммунизированных мышей замедлился (рис. 5, Б). После инкубации клеток с сывороткой крови мышей, иммунизированных белком *PRAME*, подавление роста клеток было более выраженным, и увеличилось число мертвых клеток (рис. 5, В). После инкубации клеток с МКА 5D3F2 внутри клеток усилилась зернистость (рис. 5, Г). Дальнейший рост и размножение таких клеток после воздействия МКА затруднены. На изображении видно, что у клеток обнаруживаются признаки их гибели. Совместная инкубация МКА и сыворотки крови иммунизированных мышей подавляла рост клеток почти в 5 раз по сравнению с контролем и увеличивала число мертвых клеток в этом случае уже до 50 % (рис. 6).

Обсуждение

Известно, что экспрессия большинства РТА на уровне белка происходит в основном в ядре, а в незначительном количестве белки локализованы в цитоплазме. Согласно данным, представленным ранее другими авторами, локализация *PRAME* возможна как перинуклеарно, так цитоплазматическая и мембранная. Результаты, полученные в разных лабораториях, не совпадают, и это можно объяснить разницей в использованных экспериментальных подходах. К примеру, в работе Tajeddine et al. локализацию белка *PRAME* определяли после его слияния с белком FLAG [33]. Используя МКА, выработанные к FLAG, иммуноцитохимическими ме-

тодами обнаружили ядерную и перинуклеарную локализацию гибридного белка *PRAME*-FLAG. Методом иммуноблоттинга с поликлональными антителами к *PRAME* показали ядерную локализацию белка в трансфицированных клетках CHO. Wadelin et al. использовали зеленый флуоресцирующий белок, слитый с *PRAME*, для определения локализации *PRAME*. В клетках Hela и в лейкозных линиях клеток таким образом обнаружили в основном ядерную и цитоплазматическую локализацию [34]. Фирмой Abcam представлены поликлональные антитела к полноразмерному белку *PRAME* и антитела, выработанные к рекомбинантному полноразмерному белку (amino acids 1-509), на N-конце которого добавлен tag, в результате чего молекулярная масса слитого белка *PRAME*-tag составила 81,73 кДа. По данным фирмы-производителя с помощью этих поликлональных антител локализация белка *PRAME* определяется как ядерная и мембранная. Однако при независимом использовании антител к полноразмерному рекомбинантному белку наблюдалась перекрёстная реакция с неизвестным белком массой 75 кДа [28]. В ещё одной работе локализация *PRAME* определялась МКА, выработанным к рекомбинантному белку с молекулярной массой почти в два раза меньшей, чем нативный *PRAME*. По данным Вестерн-блоттинга эти МКА связывались с клеточным белком размера 33 кДа. С помощью иммунофлуоресценции с использованием МКА была определена локализация *PRAME* как мембранная и цитоплазматическая [27]. Действительно ли МКА связывались с белком *PRAME* или ему подобным белком, осталось не ясным [34].

Таким образом, для определения локализации *PRAME* использовались либо косвенные методы с использованием гибридных белков, локализация которых в клетке может отличаться от таковой, характерной для нативного белка, либо поликлональные антитела с перекрёстной реактивностью, либо антитела, специфичность которых к *PRAME* не доказана.

Для решения этого вопроса нами были получены МКА 6H8F12 и 5D3F2 к рекомбинантному белку *PRAME*. С помощью Вестерн-блоттинга было доказано, что эти МКА специфически связываются именно с полноразмерным белком *PRAME* (рис. 1) в разных культурах клеток, имеющих высокий уровень экспрессии гена исходно (клетки эритромиелойкоза K562), либо после трансфекции гена *PRAME* вектором pCER4-*PRAME* (фибробласты человека линии WI-38).

В наших экспериментах по определению внутриклеточной локализации *PRAME* МКА 6H8F12 и 5D3F2 связывались с белком внутри клеток и на поверхности, но 6H8F12 имели преимущественное связывание на клеточной поверхности, а 5D3F2 – внутри клеток. Поскольку антитело ассоциируется с небольшим эпитопом белка, можно предположить, что эпитоп *PRAME*, распознаваемый 6H8F12, на клеточной мембране открыт, а внутри клеток недоступен. И наоборот – эпитопы, распознаваемые МКА 5D3F2, в большей степени

доступны для связывания антителом внутри клетки, чем на мембране. Фактором, способствующим доступности антигенных детерминант *PRAME*, может быть способность белка взаимодействовать с другими белками. Действительно, известен комплекс, образуемый *PRAME* и рецептором ретиноевой кислоты RAR α [17]. Флуоресценция на поверхности клеток с обоими антителами была слабее, чем внутриклеточная. Интенсивность флуоресценции клеток была прямо пропорциональна уровню экспрессии гена *PRAME* в этих клетках: чем выше уровень экспрессии *PRAME*, тем ярче флуоресценция и больше число клеток, в которых флуоресценция имела ядерную локализацию.

В исходных клеточных линиях (WI-38, B16F10), не экспрессирующих *PRAME*, флуоресценции не обнаружено. После трансфекции таких клеток конструкцией, содержащей последовательность гена *PRAME*, в них также обнаруживалась экспрессия белка внутри клеток – в цитоплазме и в ядре (табл.). Возможно, в живой клетке количество белка *PRAME* влияет на его локализацию. Чем больше наработано белка, тем большая доля белка переходит в клеточное ядро, и там *PRAME* активно связывается с NFY-распознаваемыми промоторами и энхансерами, регулируя транскрипцию других генов [14].

Интересно, что ядерная локализация *PRAME* наблюдалась нами в виде чётко различимых точек (рис. 7). В виде точек, как известно уже сейчас, под микроскопом видны так называемые ядерные тельца. Ядерные тельца представляют собой сферические структуры, образованные из транскрипционного фактора PML и оноксупрессора Sp100, которые присутствуют обязательно, и примерно сорока других, находящихся факультативно [24]. Функции, выполняемые ядерными тельцами, разнообразны (противовирусный ответ, репарация ДНК, подавление опухолевого роста и множество других), и зависят от состава белков, входящих в их структуру [11; 16].

Так, PML и Sp100 вместе предотвращают связывание корепрессора ETS1 с ДНК, что опосредованно снижает подвижность клеток и их способность к инвазии [35]. Взаимодействуя с MRN, ядерные точки стимулируют процесс восстановления длины теломера [21].

Мы предполагаем, что локализация *PRAME* в ядре в виде компактных точек также возможна в составе этих ядерных телец.

Мы показали, что кроме внутриклеточной локализации в ядре и цитоплазме, белок или его пептиды локализуются на поверхности клеток. Возможно, это именно те пептиды белка *PRAME*, которые распознаются цитотоксическими CD8⁺ Т-лимфоцитами на поверхности опухолевых клеток [19; 29; 30]. Обнаружение локализации белка *PRAME* на поверхности клеток логично в свете того, что белок является иммуногенным и распознается цитотоксическими Т-лимфоцитами.

Таким образом, с помощью полученных нами и использованных МКА к белку *PRAME* обна-

ружили связывание этих антител не только внутри, но и на поверхности клеток, что открывает возможность использования полученных МКА для терапии опухолей.

В экспериментах, проведенных на живых клетках B16F10-pCEP4-*PRAME*, нами показано: клетки, экспрессирующие *PRAME*, погибают в ответ на инкубацию со специфическими к *PRAME* МКА 5D3F2. В присутствии анти-*PRAME* антител рост этих клеток значительно замедлялся, и увеличивался процент мертвых клеток, что расценивалось как цитостатический эффект.

Поскольку МКА не могут проникать внутрь живых клеток, возможно, что они связываются либо с какими-то рецепторами, в состав которых входит белок *PRAME*, либо с экспонированными на поверхности клеток пептидами белка *PRAME*. МКА распознают мишень на поверхности клеток, и таким образом осуществляется цитостатическое воздействие на клетки, экспрессирующие *PRAME* (рис. 5–6).

Ранее нами было показано, что иммунизация мышей рекомбинантным белком *PRAME* вызывала значительный гуморальный ответ, который определяли по высокой экспрессии анти-*PRAME* IgM и IgG антител у иммунизированных мышей, и приводила к подавлению роста опухолей *in vivo* [23].

Повышение уровня экспрессии *PRAME* происходит при многих опухолевых заболеваниях. Поэтому в перспективе можно разработать препарат для направленного действия против нескольких видов опухолей, экспрессирующих *PRAME*. Ограничением для применения *PRAME* как иммуногенного белка может быть его экспрессия в стволовых CD34⁺ клетках костного мозга и периферической крови [32], но его экспрессия в этих клетках намного ниже, чем в лейкозных клетках.

Итак, полученные нами МКА 5D3F2 и 6H8F12 обладают специфичностью к опухолевым клеткам, экспрессирующим ген *PRAME*, поскольку они оказывают цитостатическое действие на опухолевые клетки (трансфицированные геном *PRAME* клетки мышинной меланомы) при их непосредственном взаимодействии. Нами обнаружена корреляция между уровнем экспрессии гена *PRAME* и локализацией белка в клетке.

Когда в клетке наблюдается достаточно высокий уровень экспрессии гена *PRAME*, белок локализован в основном в ядре и цитоплазме, если уровень экспрессии гена *PRAME* низкий, белок локализован чаще в цитоплазме и на поверхности клетки. Поскольку известно об иммуногенных свойствах *PRAME*, обнаружение его белков или пептидов на поверхности клеток говорит о возможности его использования в качестве мишени для терапии опухолей [2; 3; 8].

Выражаем благодарность за помощь при получении МКА сотрудникам ФГБУ Гематологического научного центра Министерства здравоохранения РФ в г. Москве Н.И. Дризе и Н.И. Оловниковой.

Литература

1. Абраменко И.В., Белоус Н.И., Крячок И.А. и др. Экспрессия гена PRAME при множественной миеломе // Терапевтический архив. – 2004. – Т. 76, № 7. – С. 77–81.
2. Барышников А.Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2004. – № 2. – С. 59–63.
3. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Кадагидзе З.Г. и др. Современные проблемы биотерапии злокачественных опухолей // Вестник Московского онкологического общества. – 2008. – № 1. – С. 6–10.
4. Гапонова Т.В., Менделеева Л.П., Мисюрин А.В. и др. Экспрессия опухолеассоциированных генов PRAME, WT1 и XIAP у больных множественной миеломой // Онкогематология. – 2009. – 2 – С. 52–7.
5. Мисюрин В.А. Аутосомные раково-тестикулярные гены // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 77–82.
6. Мисюрин В.А., Лукина А.Е., Мисюрин А.В. и др. Особенности соотношения уровней экспрессии генов PRAME и PML/RARA в дебюте острого промиелоцитарного лейкоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – 13, № 1. – С. 9–16.
7. Мисюрин В.А., Мисюрин А.В., Кесаева Л.А. и др. Новые маркеры прогрессирования хронического миелолейкоза // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2014. – Т. 7, № 2. – С. 206–12.
8. Новиков В.В., Евсегнеева И.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы при социально значимых инфекциях // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4., № 2. – С. 100–5.
9. Финашутина Ю.П., Мисюрин А.В., Ахлынина Т.В. и др. Получение рекомбинантного раково-тестикулярного белка PRAME и моноклональных антител к нему // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 3. – С. 29–37.
10. Asai D.J., Wilder J.K. Making monoclonal antibodies // Methods in Cell Biology. – 1993. – 37. – P. 57–74.
11. Borden K.L. Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies // Mol. Cell. Biol. – 2002. – 22. – P. 5259–69.
12. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem. – 1987. – 162. – P. 156–9.
13. Costessi A., Mahrour N., Sharma V. et al. The Human EKC/KEOPS Complex Is Recruited to Cullin2 Ubiquitin Ligases by the Human Tumour Antigen PRAME // PLoS One. – 2012. – 7(8). – e42822. doi: 10.1371/journal.pone.0042822.
14. Costessi A., Mahrour N., Tijchon E. The tumour antigen PRAME is a subunit of a Cul2 ubiquitin ligase and associates with active NFY promoters // EMBO J. – 2011. – 30(18). – 3786–98.
15. Costessi A., Mahrour N., Tijchon E. et al. The tumour antigen PRAME is a subunit of a Cul2 ubiquitin ligase and associates with active NFY promoters // EMBO J. – 2011. – 30. – P. 3786–98.
16. Dellaire G., Bazett-Jones D.P. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress // Bioessays. – 2004. – 26(9). – P. 963–77.
17. Epping M.T., Wang L., Edel M.J. et al. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling // Cell. – 2005. – 122 (6). – P. 835–47.
18. Goodison S., Urquidi V. The cancer testis antigen PRAME as a biomarker for solid tumor cancer management // Biomark Med. – 2012. – 6(5). – P. 629–32.

19. Griffioen M., Kessler J.H., Borghi M. et al. Detection and functional analysis of CD8+ T cells specific for PRAME: a target for T-cell therapy // Clin. Cancer Res. – 2006. – 12. – P. 3130–6.
20. Kewitz S., Staeger M.S. Knock-Down of PRAME Increases Retinoic Acid Signaling and Cytotoxic Drug Sensitivity of Hodgkin Lymphoma Cells // PLoS ONE. – 2013. – 8 (2). – e55897. doi: 10.1371/journal.pone.0055897.
21. Kim M.K., Kang M.R., Nam H.W. et al. Regulation of telomeric repeat binding factor 1 binding to telomeres by casein kinase 2-mediated phosphorylation // J Biol Chem. – 2008. – 283(20). – 14144–52.
22. Mikhaylova I.N., Morozova L.F., Golubeva V.A. et al. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines // Melanoma Research. – 2008. – 18(5). – P. 303–13.
23. Misyurin A., Lapshyna N., Aksenova E., Akhlynina T., Finashutina Y. PRAME recombinant protein vaccination causes significant tumor reduction in the animal model. 15th congress of the European hematology association, Barcelona, Spain. June 10 - 13, 2010 // Haematologica. – 2010. – 95 (s2). – 306.
24. Negorev D., Maul G.G. Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot // Oncogene. – 2001. – 20(49). – P. 7234–42.
25. Oehler V.G., Guthrie K.A., Cummings C.L. et al. The preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) inhibits myeloid differentiation in normal hematopoietic and leukemic progenitor cells // Blood. – 2009. – 114(15). – P. 3299–308.
26. Proto-Siqueira R., Falcao R.P., de Souza C.A et al. The expression of PRAME in chronic lymphoproliferative disorders // Leuk. Res. – 2003. – 27. – P. 393–6.
27. Proto-Siqueira R., Figueiredo-Pontes L.L. et al. PRAME is a membrane and cytoplasmic protein aberrantly expressed in chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma // Leuk. Res. – 2006. – 30. – P. 1333–9.
28. Quintarelli C., Dotti G., De Angelis B. et al. Cytotoxic T lymphocytes directed to the preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia // Blood. – 2008. – 112. – P. 1876–85.
29. Quintarelli C., Dotti G., Hasan S.T. et al. High-avidity cytotoxic T lymphocytes specific for a new PRAME-derived peptide can target leukemic and leukemic-precursor cells // Blood. – 2011. – 117. – P. 3353–62.
30. Rezvani K., Yong A.S.M., Tawab A. et al. Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8 T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and acute and chronic myeloid leukemia // Blood. – 2009. – 113. – P. 2245–55.
31. Santamaria C., Chillon M.C., Garcia-Sanz R. et al. The relevance of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) as a marker of disease activity and prognosis in acute promyelocytic leukemia // Haematologica. – 2008. – 93(12). – P. 1797–805.
32. Steinbach D., Hermann J., Viehmann S. et al. Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia // Cancer Genet. Cytogenet. – 2002. – 133. – P. 118–23.
33. Tajeddine N., Gala J.L., Louis M. et al. Tumor-associated antigen preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) induces caspase-independent cell death in vitro and reduces tumorigenicity in vivo // Cancer Res. – 2005. – 65. – P. 7348–55.
34. Wadelin F., Fulton J., McEwan P.A. et al. Leucine-rich repeat protein PRAME: expression, potential functions and clinical implications for leukaemia // Molecular Cancer. – 2010. – 9. – P. 226–36.
35. Yordy J.S., Li R., Sementchenko V.I. et al. SP100 expression modulates ETS1 transcriptional activity and inhibits cell invasion // Oncogene. – 2004. – 23(39). – P. 6654–65.