

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ПОЛУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ ИЗ ЛИНИИ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы


направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

биологического факультета

Апатьевой Марины Игоревны

Научный руководитель:

кандидат биол. наук, доцент



30.05.24 А. А. Галицкая

Научный консультант:

доктор биол. наук,


в.н.с. лаборатории иммунохимии

ИБФРМ РАН


30.05.24 С. А. Староверов

Заведующий кафедрой:

доктор биол. наук, профессор


30.05.24 С. А. Коннова

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания являются одной из ведущих причин смертности в мире, за 2020 год унесшей жизни более 10 миллионов человек. Трансформация нормальной клетки организма в раковую происходит под воздействием канцерогенов и сопровождается многочисленными изменениями в ферментативной активности клетки, а также синтезом некоторых продуктов метаболизма – опухолеассоциированными антигенами, которые являются опухолевыми маркерами (онкомаркерами) и используются в клинической практике для диагностики первичной опухоли и ее метастазов.

Основная трудность использования молекулярных маркеров в качестве инструментов скрининга рака состоит в том, что очень маленькие опухоли, которые необходимо обнаружить и удалить до метастазирования в другие органы, могут не продуцировать достаточное количество онкомаркеров для обнаружения в крови или моче. Чтобы сделать раннее обнаружение возможным, необходимо, с одной стороны, разработать сверхчувствительные методы для детекции малых концентраций аналита в жидкостях, а с другой – определить специфичные для конкретных опухолей онкомаркеры, обнаружение которых сможет с высокой вероятностью подтверждать протекание опухолевого процесса в организме.

Целью данной работы является выделение опухолеассоциированных антигенов и получение специфичных к ним фаговых антител.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Провести анализ современной научной литературы и охарактеризовать основные онкомаркеры, используемые при диагностике онкологических заболеваний.
2. Выделить белки теплового шока как антигены опухолевых клеток.
3. Получить фаговые антитела на белки теплового шока, проверить их специфичность.

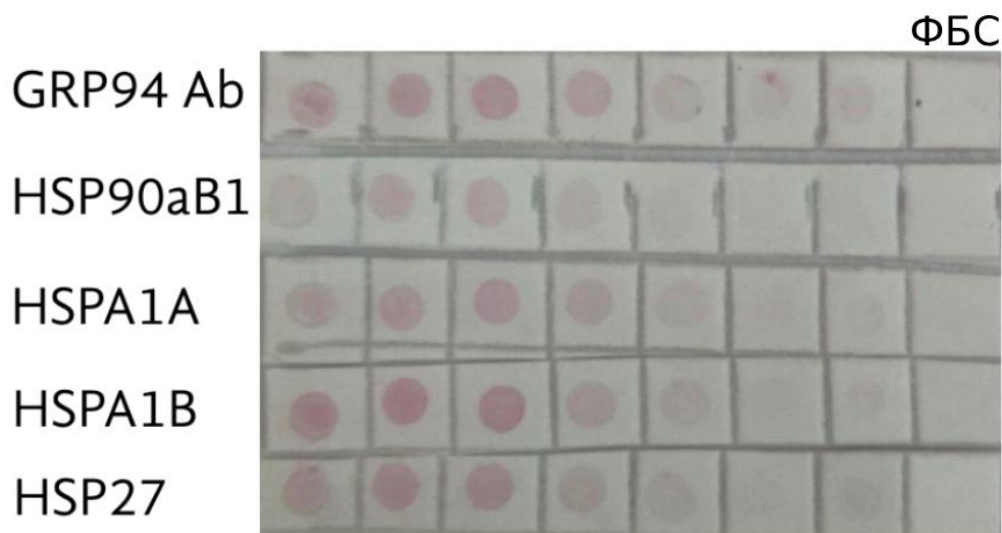
Структура работы обусловлена целью и задачами исследования, включает обозначения и сокращения, введение, три раздела (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение), выводы, заключение, список использованных источников.

Проанализировано 77 литературных источников русскоязычных и иностранных авторов. Они составили теоретическую и методологическую основу исследования.

В разделе Материалы и методы описана структура экспериментов, перечислены основные методики. В разделе Результаты и их обсуждение представлен экспериментальный материал и анализ полученных результатов.

На первом этапе проводили выделение опухолеассоциированных антигенов. Для выделения антигенов, представляющих собой белки теплового шока, использовали опухолевые клетки мышинной миеломы (клеточная линия Р3Х63Аg8.653). Выращивали клетки методом монослойного культивирования и подвергали их температурному стрессу.

Содержание разных фракций белков теплового шока в клеточном лизате было подтверждено с помощью dot-blot-иммуноанализа (рисунок 1).



На мембрану наносили серию последовательных двукратных разведений антигенов, начиная с 100 мкл на точку. ФБС – фетальная бычья сыворотка, используемая в качестве контроля.

Рисунок 1 – Результаты dot-иммуноанализа по содержанию в лизате клеток разных фракций БТШ

GRP94 – глюкозо-регулируемый HSP90-подобный белок теплового шока, шаперон, обнаруживаемый в просвете эндоплазматического ретикулума. Является одним из основных Ca^{2+} -связывающим белком. Изменение баланса Ca^{2+} инициирует клеточный ответ, который обрабатывается преобразователями клеточного сигнала, расположенными в мембране эндоплазматического ретикулума, и запускает сложную сигнальную систему, известную как стрессовый ответ ЭПР или ответ на денатурацию белка (UPR). Целью этой системы, как и соответствующей стрессовой сигнализации в цитозоле, является либо восстановление гомеостаза, либо переключение клетки на апоптоз. Существует множество литературных данных о пептид-связывающей активности GRP94, а также о стимулировании им Т-клеточного иммунного ответа. GRP94 ранее обнаруживался в опухолевых тканях как сверхэкспрессируемый белок, и dot-анализ клеточного лизата подтверждает его повышенное содержание в опухолевых клетках, подвергшихся температурному стрессу.

Также было обнаружено особенно высокое содержание в клеточном лизате белка HSP27. Этот белок вовлечен в защиту клетки от запрограммированной клеточной гибели путем ингибирования каспазозависимого апоптоза.

Обнаруженный в опухолевых клетках белок HSPA1A – представитель семейства HSP70. Помимо защиты белков от воздействия изменяющихся условий среды HSPA1A выполняет репаративную функцию в отношении ДНК, а также оказывает антиапоптотический эффект.

Другой белок семейства HSP70, обнаруженный в клеточном лизате – HSPA1B. Генетические последовательности, кодирующие белки HSPA1A и HSPA1B, почти идентичны: немногочисленные различия представлены синонимичными заменами нуклеотидов.

Пятна на мембране, соответствующие белку HSP90aB1, имеют менее интенсивное окрашивание. Этот белок, помимо защитной функции, выполняет еще и транспортную: с ними связываются внутриклеточные стероидные рецепторы для транслокации (транспорта) из цитоплазмы в ядро.

Таким образом, из опухолевых клеток были выделены белки теплового шока, которые будут выступать в качестве антигенов для селекции фаговых антител из наивной фаговой библиотеки.

Далее мы получали мини-антитела на БТШ, используя технологию фагового дисплея. Для наработки элюированных фагов, специфичных к антигену, культивировали *Echerichia coli* штамм TG-1.

Специфичность полученных на БТШ фаговых антител была подтверждена методом dot-blot-иммуноанализа. Результаты визуализированы на мембране, где конъюгаты антифаговых антител и золотых наночастиц связались с комплексом антиген/антитело и проявились в виде окрашенных пятен (рисунок 2). В качестве контроля использовали белки бычьей сыворотки.



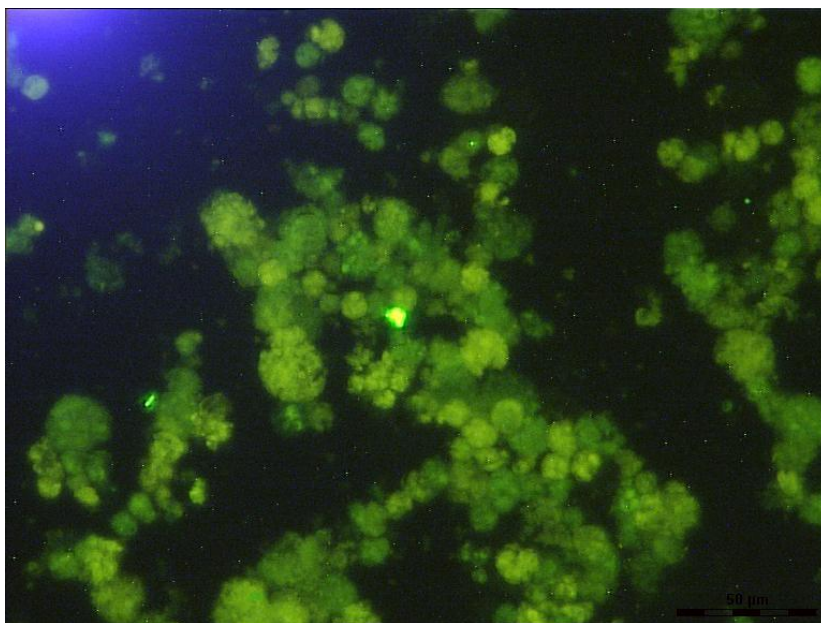
К – контроль, вместо антигена на мембрану наносили белки бычьей сыворотки

Рисунок 2 – Dot-иммуноанализ комплекса антиген/фаговое антитело с использованием 15 нм коллоидного золота в качестве метки

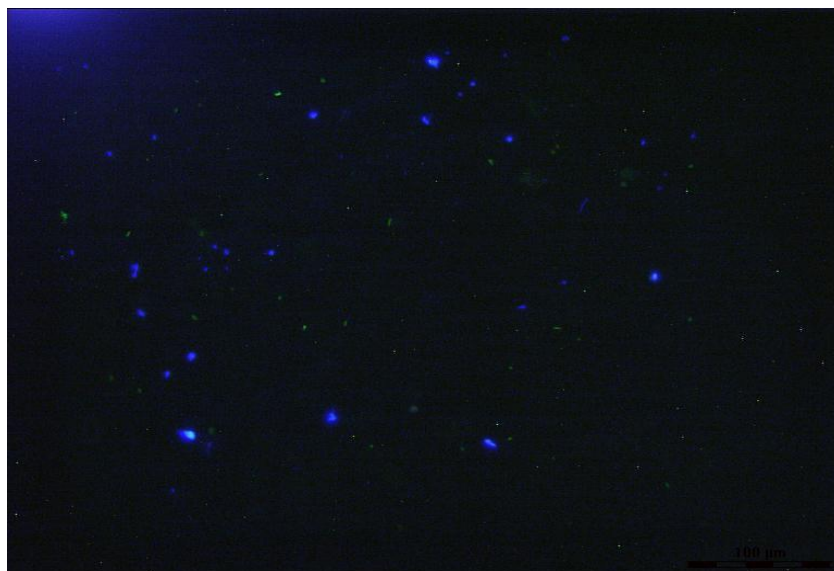
Фаговые антитела метили зеленым флуоресцентным красителем ФИТЦ, ядра клеток окрашивали синим флуоресцентным красителем DAPI. Были получены микрофотографии клеток со связавшимися с ними фаговыми антителами (рисунок 3). По наличию интенсивной зеленой флуоресценции, полученной мечением фаговых антител красителем ФИТЦ, можно сделать вывод об их успешном связывании с клетками линии P3X63Ag8.653.

Контроль специфичности фаговых антител проводили на клеточной линии СНО-III (рисунок 4). Эти клетки, в отличие от экспериментальной клеточной линии P3X63Ag8.653, не синтезировали большого количества БТШ, и связывания фаговых антител с ними не происходило. Синяя флуоресценция клеток на микрофотографии обусловлена окрашиванием красителем DAPI,

проникающим в ядро клетки и окрашивающим нуклеиновые кислоты. Немногочисленные зеленые точки представляют собой неотмывшиеся окрашенные фаговые частицы.



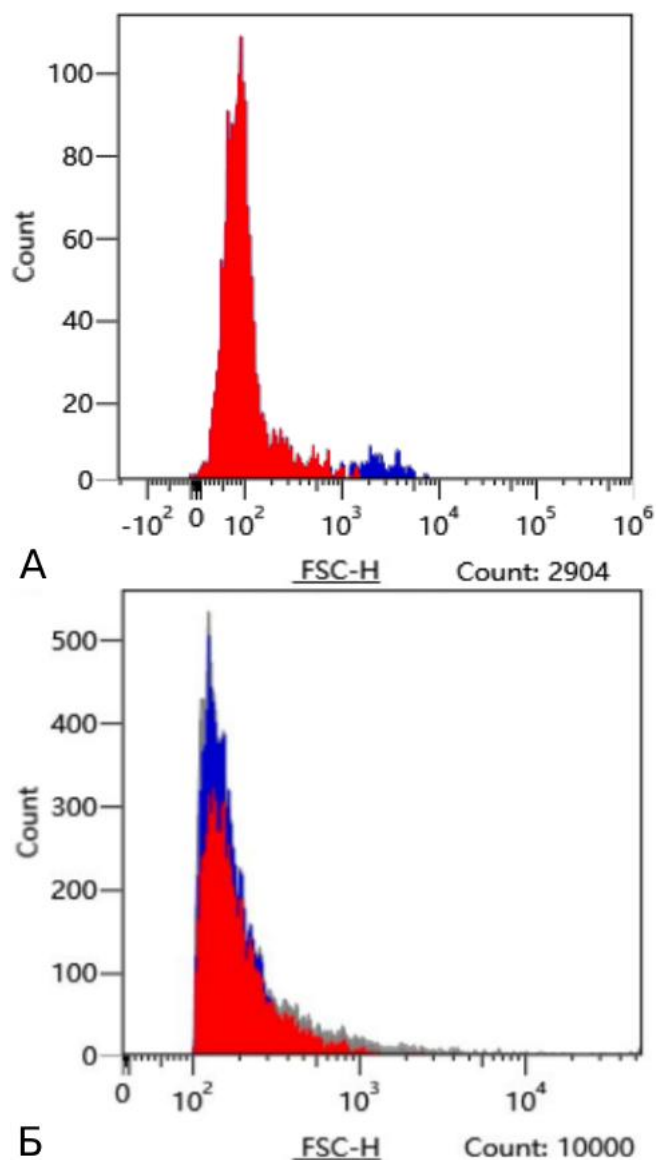
Зеленая флуоресценция получена мечением фаговых частиц красителем ФИТЦ
Рисунок 3 – Микрофотография клеток линии P3X63Ag8.653 со связавшимися с ними фаговыми частицами, увеличение в 40 раз



Синяя флуоресценция получена окрашиванием клеточных ядер красителем DAPI
Рисунок 4 – Микрофотография клеток контрольной линии СНО-III, инкубированной с мечеными фаговыми антителами, увеличение в 40 раз

Максимальный титр полученных фаговых антител определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). При постановке иммуноферментного анализа суспензию фаговых частиц разводили в 10 раз, после чего проводили серию последовательных двукратных разведений. Таким образом был определен максимальный титр антител, который составил 1:10240, что свидетельствует о высокой концентрации полученных фаговых антител в суспензии и их высокой аффинности.

Далее для проверки специфичности фаговых антител использовали метод проточной цитофлуориметрии. Он основан на регистрации флуоресценции и светорассеяния от отдельных клеток или частиц, проходящих через лазерный луч в струе жидкости. Он позволяет исследовать диссоциированные клетки любых тканей с метками. Результаты, представленные на рисунке 5, показывают, какой процент клеток из всей анализируемой популяции связались с фаговыми антителами. В качестве контроля использовали линию клеток CHO III, которая не является опухолевой. В обеих клеточных линиях ядра клеток были окрашены при помощи красителя DAPI (на графиках отмечено синим цветом). Было выявлено, что в обеих линиях клеток наблюдается связывание с полученными антителами на БТШ. Поскольку известно, что многие БТШ выполняют функции шаперонов и, соответственно, могут присутствовать во всех клетках, полученный результат вполне закономерен. Однако следует отметить, что в опухолевой линии процент клеток, связавшихся с антителами, был заметно выше и составлял 92% от всей клеточной популяции. В случае неопухолевой линии этот процент был значительно ниже и составлял всего 65%. Таким образом, клетки опухолевой линии имеют значительно большую аффинность в отношении полученных антител, что делает предложенный метод весьма перспективным для раннего скрининга опухолевых заболеваний. Отсутствие сложных этапов тонкой очистки позволяет упростить метод получения антител, что приведёт к удешевлению получаемого препарата и даст возможность его использования для быстрого и масштабного скрининга значительных групп пациентов.



А – график, полученный для экспериментальной клеточной линии Р3Х63Аg8.653, Б – график, полученный для контрольной клеточной линии СНО-III. Красным цветом обозначена доля клеток, связавшихся с фаговыми антителами, синим – с красителем DAPI

Рисунок 5 – Графики, полученные на проточном цитофлуориметре

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Детекция малых количеств опухолеассоциированных антигенов позволит в значительной степени облегчить раннюю диагностику раковых заболеваний. Однако для решения этой задачи требуются сверхчувствительные методы выявления онкомаркеров, специфических для конкретных видов опухолей.

В рамках реализации данного проекта была предложена схема выделения антигенов, специфичных для мышинной миеломы. Полученные антигены представляют собой различные БТШ. Нарботанный препарат был использован для получения антител методом фагового дисплея. Показана возможность получения комплексов препарата антител с опухолевыми клетками, позволяющая в дальнейшем использовать полученные антитела для оценки развития миеломы с использованием сыворотки крови больных животных. Предложенный метод представляет интерес с точки зрения возможностей использования его для ранней диагностики опухолевых заболеваний, в том числе для масштабного скрининга.

ВЫВОДЫ

1. Из опухолевых клеток миеломы мыши (клеточная линия P3X63Ag8.653) были выделены белки теплового шока, являющиеся опухолеассоциированными антигенами.
2. С помощью технологии фагового дисплея были получены фаговые мини-антитела к белкам теплового шока, специфичные для данной клеточной линии. Специфичность была подтверждена методами dot-блоттинга, проточной цитофлуориметрии, флуоресцентной микроскопии.
3. Был определен максимальный титр фаговых антител, который может быть использован для детектирования антигенов в сыворотке животных.

