

Алогенний скринінг пухлинних антигенів з кДНК бібліотек раку щитовидної залози

Р. Г. Кіямова¹, М. В. Роднін¹, О. М. Гаріфулін¹, І. О. Тихонкова¹,
К. П. Корольова², М. С. Малець³, І. Т. Гут^{1, 4}, В. В. Філоненко¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

² Інститут молекулярної біології ім. Енгельгардта РАН
Вул. Вавилова, 32, Москва, 119991, РФ

³ Київська міська онкологічна лікарня
Вул. Верховинна, 69, Київ, 03115, Україна

⁴ Людвігівський інститут ракових досліджень
Вул. Райдингхаус, 91, Лондон W1W 7BS, Велика Британія

Для пошуку нових пухлинних антигенів раку щитовидної залози людини використано метод SEREX. Ідентифіковано 16 різних антигенів шляхом скринування аутологічними сироватками двох експресуючих кДНК бібліотек, виділених з тканин папілярних карцином раку щитовидної залози. Здійснено алогенний скринінг одержаних антигенів сироватками здорових донорів, а також пацієнтів, хворих на рак щитовидної і молочної залоз та товстого кишечника. Вісім антигенів прореагували виключно з аутологічними сироватками, два (KY-Thy-25 та KY-Thy-40) — лише з сироватками пацієнтів, хворих на рак щитовидної і молочної залоз (10 та 2,4 % відповідно), а решта антигенів прореагувала як із сироватками здорових донорів, так і хворих на рак. KY-Thy-17 (білок, який містить мотив «цинковий палець» типу C2H2), KY-Thy-28 (переносник ERBB2) та KY-Thy-29 (білок, асоційований з солідними пухлинами) виявили високу імунореактивність із сироватками пацієнтів, хворих на рак щитовидної та молочної залоз і раком товстого кишечника, у порівнянні з сироватками здорових донорів. Згадані антигени можуть бути перспективними для розробки на їхній основі нових діагностичних та імунотерапевтичних підходів при ракових захворюваннях.

Вступ. Рання діагностика та імунотерапія пухлин базується на пошуку пухлинних антигенів, здатних викликати гуморальну та клітинну імунну відповідь у онкологічних хворих. Пухлиноасоційовані антигени, ідентифіковані на сьогодні, можна розподілити на п'ять груп: 1) ембріоспецифічні антигени (CT-cancer-testis), які експресуються у різних типах пухлин і відсутні в нормальних тканинах, за винятком сім'яників; 2) антигени диференціації меланоцитів, що експресуються в меланомах і нормальних меланоцитах; 3) антигени, які виникли

внаслідок точкових мутацій відповідних генів; 4) власні антигени, експресія яких підвищена в злоякісних клітинах у порівнянні з нормальними тканинами; 5) вірусні антигени [1]. Перераховані антигени можуть бути мішенями як для гуморальної, так і клітинної імунної відповіді. Нещодавно запропоновано методологію SEREX — serological analysis of recombinant cDNA expression libraries [2], що дозволяє проводити ефективний пошук пухлинних антигенів та полягає у створенні кДНК експресуючих бібліотек з пухлин пацієнтів, скринування їх за допомогою аутологічної сироватки наступною ідентифікацією та характеристикою позитивних клонів.

© Р. Г. КІЯМОВА, М. В. РОДНІН, О. М. ГАРІФУЛІН,
І. О. ТИХОНКОВА, К. П. КОРОЛЬОВА, М. С. МАЛЕЦЬ,
І. Т. ГУТ, В. В. ФІЛОНЕНКО, 2004

На сьогодні база даних SEREX нараховує більш ніж 2000 антигенів, деякі з яких (MAGE-A, NY-ESO-1) успішно проходять клінічні випробування [3]. Слід зазначити, що не всі антигени, виявлені за допомогою SEREX, мають безпосереднє відношення до етіології раку. Використання пухлинних антигенів у серологічних тестах для імунодіагностики раку потребує вивчення їхньої імунореактивності з сироватками хворих на різні типи злоякісних пухлин (алогенний скринінг). Методологія SEREX дозволяє здійснювати широкомасштабний алогенний скринінг виявлених антигенів панеллю сироваток здорових донорів і пацієнтів з різними видами раку. Для імунотерапевтичних цілей використання серологічно ідентифікованих антигенів потребує додаткового аналізу Т-клітинної відповіді, зокрема, цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ), які спеціалізуються на розпізнаванні ракових клітин. Накопичення знань про МНС-зв'язуючі мотиви дозволило ідентифікувати пептиди, які впізнаються Т-клітинами, і такий підхід був використаний у роботі [4] для визначення пептидів з NY-ESO-1, які впізнаються ЦТЛ пацієнтів з високим титром антитіл проти NY-ESO-1.

Інтенсивні дослідження раку щитовидної залози стали особливо актуальними в Україні після Чорнобильської катастрофи, коли темпи зростання захворюваності збільшилися в декілька разів. Метою даної роботи було визначення імунореактивності антигенів з ракових пухлин щитовидної залози людини за допомогою методології SEREX та вивчення їхньої імунореактивності з сироватками крові хворих на рак щитовидної, молочної залози та товстого кишечника у порівнянні з сироватками здорових донорів.

Матеріали і методи. Виділення мРНК і конструювання кДНК експресуючих бібліотек. Сумарну РНК виділяли за допомогою гуанідинізоціанатного методу [5] з операційного матеріалу пухлин (300—400 мг). Матричну РНК очищували афінною хроматографією на носії Dynabeads Oligo (dT)₂₅ («Dyna», Норвегія). мРНК (5 мкг) використовували для конструювання кДНК, яку лігували з лямбда ZAP11 експресуючим вектором («Stratagene», США). Розмір вставки складав 0,5—3,0 тис. н.

Імуноскринінг кДНК бібліотек. Сироватки і тканини. Операційний матеріал, люб'язно наданий морфологічною лабораторією «БІОНТЕК» (Україна), заморожували у рідкому азоті і зберігали при температурі 80 °С. Сироватку для імуноскринінгу зберігали при -20 °С з 50 %

глицерину. Для видалення з сироватки імуноглобулінів, які реагують з бактеріальними і фаговими антигенами, її збіднювали двома способами. Сироватку, розведену 1:10 в TBS (10 мМ трис-НCl, рН 8,0, 150 мМ NaCl), інкубували послідовно з носіями Y 1090 і BNN 97 (5Prime-3Prime, Inc. США, Канада), ковалентно зв'язаними з білками *Escherichia coli* XL-1 Blue MRFB і нерекомбінантного фага лямбда. Афінно збіднені сироватки розводили 1:100 TBS з додаванням 0,2 % знежиреного молока і 0,05 % NaN₃. В іншому разі розведену 1:100 TBS сироватку (0,2 % знежиреного молока і 0,05 % NaN₃) інкубували протягом ночі з нітроцелюлозною мембраною з сорбованими білками *E. coli* XL-1 Blue MRFB і нерекомбінантного фага лямбда. Розведену і збіднену сироватку зберігали упродовж кількох місяців при 4 °С.

Первинний і вторинний імуноскринінг. Імуноскринінг кДНК бібліотек здійснювали аутологічними сироватками за допомогою відомого методу [6]. При первинному скринінгу клітини XL-1 Blue MRFB інфікували рекомбінантним λ ZAP експресуючим фагом (6·10³ на 15-см чашку) і вирощували при температурі 37 °С протягом 5—6 год до появи прозорих фагових бляшок.

Експресію рекомбінантних білків індукували додаванням 5 мМ ізопропіл-β-D-тіогалактозиду (ІПТГ) («Sigma», США). Фагові білки з поверхні агарози на нітроцелюлозну мембрану переносили упродовж ночі при 37 °С. Вільні сайти зв'язування на мембрані блокували 5 %-м молоком, після чого ідентифікували клони імуноглобулінів. Для цього мембрани інкубували з antihuman IgG (Fc-specific) пероксидазним кон'югатом («Sigma») протягом 1 год при кімнатній температурі, після чого візуалізували при взаємодії з DAB (3,3-діамінобензидинтетрахлоридом) («Sigma»).

Позитивні клони вилучали з подальшого аналізу. Нітроцелюлозні мембрани інкубували протягом ночі з аутологічною збідненою сироваткою при кімнатній температурі. Після промивань (TBS + 0,5 % твін) мембрани інкубували з фосфатазним кон'югатом («Sigma») і позитивні бляшки візуалізували при взаємодії з нітротетразолієвим блакитним (NBT) і 5-бром-4-хлор-3-індолілфосфатом (BCIP) («Sigma»). Позитивні клони ізолювали і використовували для вторинного скринінгу за тією ж методикою, але на 9-см чашки Петрі висівали 3·10² фагових часток.

Секвенування ДНК. Позитивні фагові ДНК клони конвертували у фагмиду *pBlueScript* за допо-

могою реакції *in vivo excision* згідно з методикою фірми «Stratagene». Вставки кДНК секвенували з використанням DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit («Amersham Biosciences», Велика Британія) на ABI Prism автоматичному ДНК секвенаторі («Perkin Elmer», США).

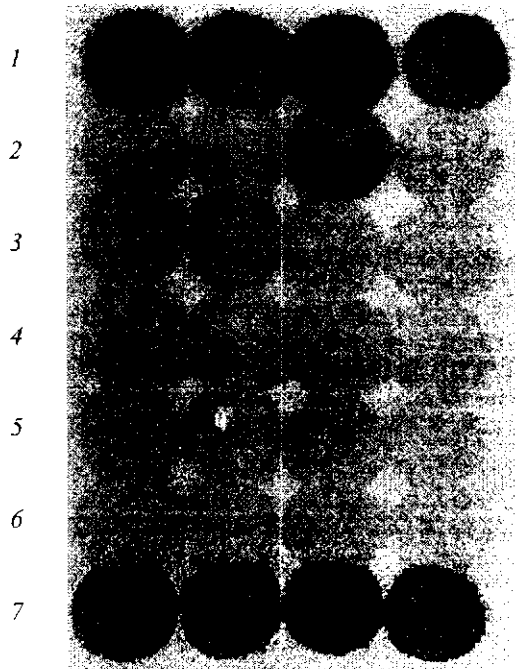
Алогенний імуоскринінг. 2 мкл кожного фагового стоку (500 фагових часток в 1 мкл) наносили на поверхню чашки з TOP агаром (LB, 0,7 % агарози, 5 мМ IPTG), який містив 200 мкл клітин XL-1 Blue MRFB ($OD_{600} = 0,7$). Після появи прозорих фагових пляшок (через 4—5 год) їх перенесли на нітроцелюлозну мембрану протягом ночі. Мембрани блокували 5 %-м молоком, інкубували з гетерологічними сироватками і після обробки фосфатазним кон'югатом і NBT та BCIP візуалізували позитивні клони (рисунок).

Результати і обговорення. Раніше в нашій лабораторії було сконструйовано чотири кДНК експресуючі бібліотеки з ракових пухлин щитовидної залози (папілярна карцинома): Thy1 і Thy2 [7], Thy3 і Thy4 [8]. Секвенуванням кДНК з позитивних клонів виявлено, що вони відповідають 28 різним антигенам, які були унікальними в усіх досліджених бібліотеках. Кожен з ідентифікованих антигенів занесено до бази даних SEREX Інституту ракових досліджень Людвіга (www.licr.org/SEREX.html) як KY-Thy1—KY-Thy45 у відповідності з раніше прийнятою номенклатурою.

У роботі проаналізовано позитивні клони, одержані з бібліотек Thy3 і Thy4 (табл. 1). Аналіз первинних послідовностей кДНК позитивних клонів з використанням SEREX бази даних показав, що два з них, а саме — KY-Thy17 (білок, який містить «цинковий палець» типу C2H2) і KY-Thy19 (альфа-катенін) — ідентифіковані раніше іншими дослідниками при аналізі кДНК бібліотек з сім'яників (HOM-TSsem3-82, Tuereci, HOM-TS-GLI-23, Pfreundschuh), раку нирки (NY-REN-13, Scanlan), яєчників людини (MO-OVA-46 і MO-OVA-83, MO-REN 230, Недоспасов). Інші 15 антигенів знайдені нами вперше і являють собою білки як з відомою, так і невідомою функцією (табл. 1).

Подальший аналіз SEREX клонів у першу чергу був спрямований на виявлення серед них антигенів, які реагують з сироватками онкологічних хворих, але не взаємодіють з сироватками здорових донорів (алогенний скринінг).

Для визначення частоти і специфічності імунної відповіді проти одержаних антигенів нами проаналізовано імуореактивність 16 антигенів як із



імуореактивність позитивних клонів із сироваткою хворого на рак щитовидної залози: 1, 7 — позитивний контроль (клони Ig); 4 — негативний контроль (клони нерекомбінантного фага λ); 2 — клони 25, 19, 17, 16; 3 — 31, 29, 28, 27; 5 — 39, 37, 36, 32; 6 — 44, 43, 41, 40; Thy17 — білок, який містить мотив «цинковий палець» типу C2H2; Thy19 — білок, асоційований з солідними пухлинами

сироватками здорових донорів (71 сироватка), так і пацієнтів, хворих на рак молочної залози (42 випадки), товстого кишечника (20) і щитовидної залози (20). З 16 антигенів шість прореагували з сироватками здорових донорів з частотою від 1,4 до 25,3 % (табл. 2). З останніх 10 антигенів вісім прореагували виключно з аутологічною сироваткою. Два антигени (KY-Thy25 і KY-Thy40) прореагували з гетерологічними сироватками пацієнтів, хворих на рак щитовидної і молочної залоз (10 і 2,4 % відповідно), що робить їх перспективними для діагностики даних видів раку.

KY-Thy25 являє собою ген *FXYD3* — регулятор іонного транспорту, який містить специфічний домен *FXYD* (35 амінокислотних залишків) і належить до родини невеликих мембранних білків. KY-Thy40 є частиною гена, який кодує катепсин Н з родини пептидаз С1 і бере участь у деградації лізосомних білків. Суперекспресія відповідного гена корелює з прогресією багатьох новоутворень, у тому числі раку простати [9].

Як правило, антигени, які реагують з сироватками здорових донорів, не становлять інтересу для імунодіагностики раку, тому більшість дослідників

Таблиця 1

Ідентифікація позитивних клонів раку щитовидної залози, які були виявлені за допомогою методології SEREX

Клон	Кількість клонів	Ген	Юніген кластер	Гомологія у SEREX базі даних
ID: 2412, KY-Thy16	5	Білок, подібний до катеніну бета 1	Hs. 178576	—
ID: 2413, KY-Thy17	2	Білок, який містить мотив «цинковий палець» типу C2H2	Hs. 301055	HOM-TSsem3-82, NY-REN-21, MO-REN-23, и др.
ID: 2415, KY-Thy19	2	Альфа-катенін	—	NY-REN-13
ID: 2420, KY-Thy24	1	<i>Homo sapiens</i> 12 BAS RP11-686G8	—	—
ID: 2476, KY-Thy25	1	Регулятор іонного транспорту, який містить домен FXVD (FXVD3)	Hs. 301305	—
ID: 2478, KY-Thy27	1	HSPC041 білок (LOC 51125)	Hs. 7953	—
ID: 2479, KY-Thy28	1	ERBB2 зв'язуючий білок	Hs. 4994	—
ID: 2573, KY-Thy29	1	Білок, асоційований з солідними пухлинами	—	—
ID: 2575, KY-Thy31	2	Гомолог 2 РНК-зв'язуючого білка ссавців (Musashi) (Дрозодила)	Hs. 103512	—
ID: 2576, KY-Thy32	2	Рибосомний білок S24 (RPS24), транскрипційний варіант	Hs. 180450	—
ID: 2580, KY-Thy36	2	Секвестосома 1	Hs. 182248	—
ID: 2581, KY-Thy37	3	Міозин, легкий ланцюг	Hs. 233936	—
ID: 2583, KY-Thy39	2	Поліпептид малого ядерного рибонуклеопроїну	Hs. 77496	—
ID: 2584, KY-Thy40	1	Катепсин Н (CTSH)	Hs. 288181	—
ID: 2585, KY-Thy41	1	Регуляторна субодиниця 15А фосфатази 1	Hs. 76556	—
ID: 2587, KY-Thy43	1	Колаген типу VIII, альфа 2	Hs. 353001	—
ID: 2588, KY-Thy44	2	Клон XXbac-14E15, хромосома 6	—	—

не перевіряє їх в алогенному скринінгу, оскільки наявність антитіл у крові здорових осіб до власних антигенів обумовлена індивідуальними особливостями формування імунного статусу. Незважаючи на це, ми вирішили перевірити всі наші антигени в алогенному скринінгу. В результаті проведених досліджень виявлено, що імунореактивність декількох протестованих антигенів у сироватках онкопацієнтів спостерігалася значно частіше в порівнянні з сироватками здорових донорів (табл. 2). Наприклад, KY-Thy29 (білок, асоційований з солідними пухлинами) проявив невисоку імунореактивність з сироватками здорових донорів — один випадок з 71, але прореагував з різною ефективністю з іншими сироватками, особливо пацієнтів, хворих на рак щитовидної залози (20 %). Даний антиген кодується геном *STAG/PMEPA1* і суперекспресований у карциномах нирки, шлунка і прямої кишки [10]. Роль даного білка у канцерогенезі на сьогодні залишається невідомою.

Клон KY-Thy17 прореагував з 30 % сироваток пацієнтів з раком щитовидної залози та з 15 %

сироваток хворих на рак товстої кишки, що значно вище порівняно з результатами для сироваток здорових донорів (8,4 %) (табл. 2). Згаданий антиген виявлено раніше SEREX-аналізом багатьма дослідниками. За даними авторів роботи [11], імунореактивність білка, який містить мотив «цинковий палець» типу C2H2-38 (NY-REN21), складала у сироватках здорових донорів (0/22) 0 %, а у хворих на рак товстої кишки (3/16) — 18,7 %, раку нирки (3/32) — 9,4 %, легенів (1/15) — 6,6 % і молочної залози (0/16) — 0 %. У роботі Корольової та співавт. [12] антиген, який містить аналогічний мотив (MO-REN-23), прореагував з чотирма з 10 сироватками здорових донорів. «ДНК клону KY-Thy17 відповідає гену *C20orf104* і кодує білок, який містить мотив «цинковий палець» типу C2H2 і має ДНК-зв'язуючу активність. Цей мотив присутній у багатьох транскрипційних факторах, включаючи Sp1 і TFIIIA, а також у стероїдних і тироїдних рецепторах [13]. Крім того, для білка OZF, що теж включає 10 повторів мотиву «цинковий палець», імуногістохімічними методами пока-

Таблиця 2
Алогенний скринінг антигенів раку щитовидної залози

Клон	Ген	Сироватки			
		Здорових донорів (71)**	Рак молочної залози (42)**	Рак товстої кишки (20)**	Рак щитовидної залози (20)**
KY-Thy16	Білок, подібний до катеніну бета 1	0/71	0/42	0/20	1/20
KY-Thy17	Білок, який містить мотив «цинковий палець» типу C2H2	6/71 (8,4 %)	3/42 (7,1 %)	3/20 (15 %)	6/20 (15 %)
KY-Thy19	Альфа-катенін	1/71 (1,4 %)	0/42	0/20	0/20
KY-Thy25	Регулятор іонного транспорту, який містить домен FXYD (FXYD3)	0/71	0/42	0/20	2/20 (10 %)
KY-Thy27	HSPC041 білок (LOC 51125)	1/71 (1,4 %)	0/42	0/20	0/20
KY-Thy28	ERBB2 зв'язуючий білок	18/71 (25,3 %)	23/42 (54,8 %)	9/20 (45 %)	5/20 (25 %)
KY-Thy29	Білок, асоційований з солідними пухлинами	1/71 (1,4 %)	4/42 (9,5 %)	2/20 (10 %)	4/20 (20 %)
KY-Thy31	Гомолог 2 РНК-зв'язуючого білка ссавців (Musashi) (Дрозофіла)	0/71	0/42	0/20	1/20
KY-Thy32	Рибосомний білок S24 (RPS24), транскрипційний варіант	0/71	0/42	0/20	1/20
KY-Thy36	Секвестосома 1	0/71	0/42	0/20	1/20
KY-Thy37	Міозин, легкий ланцюг	0/71	0/42	0/20	1/20
KY-Thy39	Поліпептид малого ядерного рибонуклеопро- теїну	0/71	0/42	0/20	1/20
KY-Thy40	Катепсин Н (CTSH)	0/71	1/42 (2,4 %)	0/20	1/20
KY-Thy41	Регуляторна субодиниця 15А фосфатази 1	15/71 (21 %)	4/42 (9,5 %)	1/20 (5 %)	6/20 (30 %)
KY-Thy43	Колаген типу VIII, альфа 2	0/71	0/42	0/20	1/20
KY-Thy44	Клон XXbac-14E15, хромосома 6	0/71	0/42	0/20	1/20

П р и м і т к а. *Наведено результати імуноскринінгу антигенів аутологічною сироваткою. **У дужках зазначено кількість протестованих сироваток.

зано суперекспресію у більшості випадків раку підшлункової залози [14], а також у більш ніж 80 % випадків раку товстої кишки [15].

Великий інтерес становить антиген KY-Thy28 (ERBB2-зв'язуючий білок), який кодується геном *TOB2*. Відомо, що він бере участь у негативній регуляції клітинного циклу завдяки взаємодії з *Caf1* — компонентом транскрипційного комплексу *CCR4* [16]. Доведено його взаємодію з ERBB2 (HER2/*neu*) [17]. Онкоген ERBB2 (HER2/*neu*), кодує тирозинкіназу, належить до родини рецепторів епідермального фактора росту і є суперекспресованим майже у 25 % пухлин молочної залози [18].

На сьогодні онкоген ERBB2 широко використовується при імунодіагностиці раку молочної залози. На його основі створено комерційний препарат «Герцептин» (ERBB2-специфічні моноклональні антитіла), який успішно проходить клінічні випробування. У наших дослідженнях показано, що KY-

Thy28 (ERBB2-зв'язуючий білок) проявляє високу імунореактивність з сироватками хворих на рак молочної залози (54,8 %) і товстої кишки (45 %), однак 25,3 % здорових донорів також мають антитіла до цього антигену. Незважаючи на те, що доведено взаємодію ERBB2 з переносником ERBB2, функції останнього остаточно не вивчено і тому він є цікавим об'єктом для подальших досліджень, особливо з урахуванням одержаних нами результатів щодо його високої імунореактивності у сироватках онкопацієнтів.

Таким чином, проведеним нами алогенним скринінгом 16 антигенів панеллю сироваток здорових донорів і ракових хворих, виявлено п'ять антигенів (KY-Thy17, KY-Thy25, KY-Thy28, KY-Thy29, KY-Thy40), які є перспективними для вивчення рівня їхньої експресії у нормальних і злоякісних тканинах методами RT-PCR, Northern- та Western-блот-гібридизації. Одержані результати дозволять виробити рекомендації відносно викори-

стання згаданих антигенів для імунодіагностики та імунотерапії злоякісних новоутворень.

Автори висловлюють щире подяку Морфологічній лабораторії «БІОНТЕК» (Україна) за наданий операційний матеріал, відділу молекулярної імунології Інституту фізико-хімічної біології ім. Белозерського МДУ ім. М. В. Ломоносова (РФ) — за надану колекцію сироваток здорових донорів і пацієнтів хворих на рак молочної залози. Роботу частково було профінансовано грантом INTAS (INTAS, Open Call 97, N 890) і грантом Wellcome Trust (TG02/MER/SH, 14 February 2002).

Дослідження здійснювали в рамках співробітництва за програмою SEREX між Людвіговським інститутом ракових досліджень (Лондон) та Інститутом молекулярної біології і генетики НАН України (Київ).

R. G. Kyamova, M. V. Rodnin, O. M. Garifulin, I. O. Tykhonkova, E. P. Koroleva, M. S. Malets, I. T. Gout, V. V. Filonenko

Allogenic screening of tumor antigens from thyroid cancer cDNA libraries

Summary

The search for novel tumor-associated antigens eliciting humoral and cellular immune responses in tumor patients is an important goal in cancer diagnosis and immunotherapy. We utilized SEREX immunoscreening methodology to identify a set of novel tumor antigens, associated with thyroid cancer. 16 distinct antigens reactive with autologous sera were identified by SEREX analysis of two cDNA libraries from patients with papillary carcinoma of thyroid gland. SEREX-defined antigens were evaluated by allogenic screening with sera samples from normal donors, patients with thyroid, colon and breast cancer. The analysis showed that 8 antigens reacted exclusively with autologous sera, 2 antigens (KY-THY-25 and KY-THY-40) were recognized by sera from patients with thyroid and breast cancer (10 % and 2.4 % respectively) while the other antigens cross-reacted with the sera from both normal donors and cancer patients. KY-THY-17 (zinc finger protein), KY-THY-28 (transducer of ERBB2) and KY-THY-29 (solid tumor associated protein) exhibited high immunoreactivity with sera from patients with thyroid, breast and colon cancer, when compared with the sera from normal donors. These antigens are potential candidates for the development of novel diagnostic and immunotherapeutic approaches in cancer.

Р. Г. Киямова, Н. В. Роднін, О. М. Гарифулін, І. А. Тихонкова, Е. П. Королева, М. С. Малец, І. Т. Гут, В. В. Філоненко

Аллогенний скринінг опухолевих антигенів із кДНК бібліотек рака щитовидної залози

Резюме

Для поиска новых опухолевых антигенов рака щитовидной железы использована методология SEREX. Идентифицированы 16 различных антигенов путем скринирования аутологичной сывороткой двух библиотек кДНК, выделенных из ткани папиллярной карциномы рака щитовидной железы. Осуществ-

лен аллогенный скрининг полученных антигенов с помощью сывороток здоровых доноров, пациентов, больных раком щитовидной и молочной желез, раком толстой кишки. Показано, что восемь антигенов прореагировали исключительно с аутологичными сыворотками, два (KY-Thu25 и KY-Thu40) — только с сыворотками пациентов, больных раком щитовидной и молочной желез (10 и 2,4 % соответственно), а остальные антигены прореагировали как с сыворотками здоровых доноров, так и с сыворотками больных раком. KY-Thu17 (белок, содержащий мотив «цинковый палец» типа C2H2), KY-Thu28 (переносчик ERBB2) и KY-Thu29 (белок, ассоциированный с солидными опухолями) обнаружили более высокую иммунореактивность в сыворотках пациентов, больных раком щитовидной и молочной желез, а также раком толстой кишки по сравнению с сыворотками здоровых доноров. Перечисленные антигены являются потенциальными кандидатами для разработки на их основе новых диагностических и иммунотерапевтических подходов при раковых заболеваниях.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Jager D., Jager E., Knuth A. Immune responses to tumor antigens: implications for antigen specific immunotherapy // J. Clin. Pathol.—2001.—54.—P. 669—674.
- Sahin U., Tureci O., Schmitt H., Cochlovius B., Johannes T., Schmits R., Stenner F., Luo G., Schobert I., Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1995.—92.—P. 11810—11813.
- Scanlan M. J., Gure A. O., Jungbluth A. A., Old L. J., Chen Y. T. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy // Immunol. Rev.—2002.—188.—P. 22—32.
- Jager E., Chen Y.-T., Drijfout J. W., Karback J., Ringhoffer M., Jager D., Arand M., Wada H., Noguchi Y., Stockert E., Old L. J., Knuth A. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of HLA-A2-binding peptide epitopes // J. Exp. Med.—1998.—187.—P. 265—270.
- Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem.—1987.—162.—P. 156—159.
- Scanlan M. J., Chen Y. T., Williamson B., Gure A. O., Stockert E., Gordan J. D., Tureci O., Sahin U., Pfreundschuh M., Old L. J. Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies // Int. J. Cancer.—1998.—76.—P. 652—658.
- Роднін М. В., Тихонкова І. О., Немазаній І. О., Горлюва Л. М., Комісаренко І. В., Пальчевський С. С., Кухаренко О. П., Дробот Л. Б., Мацука Г. Х., Філоненко В. В., Гут І. Т. Серологічна ідентифікація антигенів, які зумовлюють аутоімунну реакцію при раку щитовидної залози людини // Експерим. онкологія.—2000.—22, № ...—С. 135—138.
- Rodnin N. V., Tykhonkova I. O., Kijamova R. G., Garifulin O. M., Filonenko V. V., Gout I. T. Identification of tumor-associated antigens in human thyroid papillary carcinoma // Biopolimery i klityna.—2003.—19, N 6.—P. 541—547.
- Waghray A., Keppler D., Sloane B. F., Schuger L., Chen Y. Q. Analysis of a truncated form of cathepsin H in human prostate tumor cells // J. Biol. Chem.—2002.—277, N 3.—P. 11533—11538.
- 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. Carcinogen.—2001.—32, N 1.—P. 44—53.

11. Scanlan M. J., Gordan J. D., Williamson B., Stockert E., Bander N. H., Jongeneel V., Gure A. O., Jager D., Jager E., Knuth A., Chen Y. T., Old L. J. Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma // *Int. J. Cancer.*—1999.—83, N 4.—P. 456—464.
12. Koroleva E. P., Lagarkova M. A., Mesheryakov A. A., Scanlan M. J., Old L. J., Nedospasov S. A., Kuprash D. V. Serological identification of antigens associated with renal cell carcinoma // *Rus. J. Immunol.*—2002.—7, N 3.—P. 229—238.
13. Stephen R. L., Crabtree J. E., Yoshimura T., Clayton C. L., Dixon M. F., Robinson P. A. Increased zinc finger protein zFOC 1 transcripts in gastric cancer compared with normal gastric tissue // *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.*—2003.—56.—P. 167—171.
14. Ferbus D., Flechon A., Muleris M., Hanash S., Terris B., Hammel P., Pibouin L., Dutrillaux B., Goubin G. Amplification and overexpression of OZF, a gene encoding a zinc finger protein, in human pancreatic carcinomas // *Int. J. Cancer.*—1999.—80.—P. 369—372.
15. Ferbus D., Bovin C., Validire P., Goubin G. The zinc finger protein OZF (ZNF146) is overexpressed in colorectal cancer // *J. Pathol.*—2003.—200, N 2.—P. 177—182.
16. Ikematsu N., Yoshida Y., Kawamura-Tsuzuku J., Ohsugi M., Onda M., Hirai M., Fujimoto J., Yamamoto T. Tob2, a novel anti-proliferative Tob/BTG1 family member, associates with a component of the CCR4 transcriptional regulatory complex capable of binding cyclin-dependent kinases // *Oncogene.*—1999.—18, N 52.—P. 7432—7441.
17. Matsuda S., Kawamura-Tsuzuku J., Ohsugi M., Yoshida M., Emi M., Nakamura Y., Onda M., Yoshida Y., Nishiyama A., Yamamoto T. Tob, a novel protein that interacts with p185^{erbB2}, is associated with anti-proliferative activity // *Oncogene.*—1996.—12, N 4.—P. 705—713.
18. Хансон К. П., Имянитов Е. Н. Онкоген ERBB2/HER2: от молекулярной к клинической онкологии // *Вопр. онкологии.*—2002.—48, № 2.—С. 137—144.

УДК 577.29:577.27
Надійшла до редакції 22.09.03