

Дослідження структурно-функціональних властивостей імуногенного фрагмента Ki-67 антигену та отримання до нього полі- і моноклональних антитіл

І. О. Тихонкова, В. В. Лізогубов¹, Ю. В. Хожаєнко¹, О. О. Довгопола²,
С. І. Коровін², Г. В. Овчаренко, В. С. Усенко¹, М. В. Роднін, В. В. Філоненко

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

¹ Морфологічна лабораторія «Біонтек»
Вул. Комсомольська, 52^а, офіс 88, Дніпропетровськ, 49000, Україна

² Інститут онкології АМН України
Вул. Ломоносова, 33/43, Київ, 03022, Україна

Дослідження особливостей функціонування асоційованих з пухлиною антигенів дає змогу розширити уявлення щодо молекулярних механізмів онкогенезу. Раніше нами ідентифіковано ядерний білок Ki-67 як один із автоантигенів меланоми людини, а кДНК імуногенного фрагмента Ki-67 антигену клонувано в pET23d вектор та експресовано у клітинах бактерій. В представленій роботі рекомбінантний пептид Ki-67, очищений з лізатів клітин бактерій, використано як антиген для отримання полі- і моноклональних антитіл. Одержані антитіла застосовано для визначення локалізації Ki-67 антигену в клітинах аденокарциноми молочної залози. Методом імунодот-блот-аналізу встановлено, що одержаному рекомбінантному фрагменту Ki-67 антигену розміром 18 кДа притаманні ДНК-зв'язувальні властивості.

Ключові слова: білок Ki-67, антитіла, імуногістохімія, ДНК-зв'язувальна активність.

Вступ. Використання методу SEREX для пошуку асоційованих з пухлинами антигенів меланоми людини дозволило виявити 10 імунореактивних клонів, чотири з яких кодували фрагменти ядерного антигену Ki-67 [1].

Ki-67 антиген ідентифіковано авторами роботи [2] при використанні моноклональних антитіл, одержаних шляхом імунізації мишей ядрами клітин лінії L428 лімфоми Ходжкіна. Білок отримав свою назву від міста Кіль (Kiel), де проводилися дослідження, та номера клону на 96-комірковому план-

шеті. Ki-67 антиген присутній в ядрі клітин протягом G1, S, G2 фаз та у мітозі, але не детектується в G0 фазі. Серія експериментів показала кореляцію між рівнем експресії Ki-67 в ядрі клітин та ступенем злоякісності пухлини [3]. Цей факт робить його гарним маркером для прогностичних і діагностичних цілей.

На сьогодні описано дві ізоформи білка: коротку і довгу з молекулярними масами 320 і 359 кДа відповідно. Вони утворюються шляхом альтернативного сплайсингу. Повну первинну структуру Ki-67 розшифровано в 1993 році. Ген Ki-67 людини (MK167) картовано на хромосомі 10q25 і встановлено, що він складається з 15 екзонів. Центральна частина гена представлена дуже довгим 13-м екзо-

© І. О. ТИХОНКОВА, В. В. ЛІЗОГУБОВ, Ю. В. ХОЖАЄНКО,
О. О. ДОВГОПОЛА, С. І. КОРОВІН, Г. В. ОВЧАРЕНКО,
В. С. УСЕНКО, М. В. РОДНІН, В. В. ФІЛОНЕНКО, 2005

ном (6845 пар основ — п. о.), який містить 16 гомологічних сегментів по 366 п. о. кожен зі ступенем гомології від 43 до 62 %, що мають назву Ki-67-повтори. Кожен з повторів містить висококонсервативний мотив з 66 п. о. (Ki-67 мотив зі ступенем гомології від 72 до 100 %) [4]. Аналіз нуклеотидної послідовності виявив декілька регуляторних послідовностей і сигнал ядерної локалізації, а також сайти для фосфорилування, меристилування та послідовностей, які можуть упізнаватися специфічними протеолітичними ферментами [5].

На жаль, роль Ki-67 у клітині досі лишається невідомою. Існує припущення, що він зв'язується з хромосомами під час мітозу. На користь цієї гіпотези свідчить наявність великої кількості позитивних зарядів в амінокислотній послідовності білка. Встановлено, що С-кінцева ділянка білка здатна зв'язувати білки гетерохроматину ссавців [6].

На цей час Ki-67 є швидким і інформативним маркером, що дозволяє визначити на гістологічних зрізах нормальні і ракові клітини, які проліферують. Існує ціла низка антитіл проти цього антигену, які успішно використовують у клініці, серед них MIB1 [4].

Матеріали і методи. Для створення і дослідження поліклональних (ПКАТ) і моноклональних (МКАТ) антитіл проти імуногенного фрагмента Ki-67 використано високоочищений препарат білка, отриманий раніше в нашій лабораторії [1]. ПКАТ і МКАТ одержували, як у роботі [7].

Імуноблотинг. Електрофорез білків проводили в 12 %-му розділювальному гелі в денатуруючих умовах за Лемлі [8]. Поліакриламідний гель після електрофорезу відмивали PBS буфером від залишків SDS і здійснювали електропереніс на нітроцелюлозну мембрану протягом 1 год на приладі Trans-blot SD («Bio-Rad», США). Нітроцелюлозний фільтр після відмивання PBS блокували буфером, який містив PBS, 5 % знежиреного молока і Tween-20 (0,1 %), упродовж 1 год. Далі відмивали буфером PBST (PBS з Tween-20 (0,1 %)) і фільтр інкубували (1 год) при кімнатній температурі з МКАТ проти фрагмента Ki-67. Потім тричі промивали PBST і наносили вторинні антимишачі антитіла («Sigma», США) і інкубували протягом 1 год. Ще тричі відмивали PBST та унаочнювали результати методом ECL за протоколом фірми «Amersham» (Велика Британія).

Імунодот-блот аналіз. ДНК сперми лосося і бактеріальну ДНК (pET28a) наносили на нітро-

целюлозну мембрану у вигляді дискретних точок в різних кількостях (від 100 до 500 нг) та висушували. Вільні центри зв'язування на нітроцелюлозі блокували PBST з додаванням 5 % знежиреного молока протягом 1 год. Отримані мембрани інкубували з препаратом рекомбінантного His-tag фрагмента Ki-67 або His-tag рІХ білка (білок аденовірусу). Взаємодію детектували за допомогою антитіл проти His-tag мітки, кон'югованих з пероксидазою хрому. Ефективність зв'язування антитіл виявляли за допомогою посиленої хемілюмінесценції.

Імуногістохімічну детекцію Ki-67 у зразках аденокарцином молочної залози здійснювали, як описано в [7]. Для аналізу використовували очищену поліклональну сироватку крові мишей у розведенні 1:1000 або культуральні середовища гібридомних клонів, які продукують антитіла до Ki-67 у розведенні 1:1000.

Результати і обговорення. Ядерний антиген Ki-67 є визнаним маркером проліферації, антитіла проти нього широко застосовуються в клініці при гістохімічних дослідженнях.

Раніше нами показано наявність антитіл проти цього білка у сироватці хворого на меланому при автологічному скринінгу кДНК експресуючої бібліотеки меланоми людини методом SEREX. Після клонування згаданого фрагмента білка, що містив 145 амінокислотних залишків (а. з.), які відповідають ділянці повнорозмірного білка з 2167 по 2311 а. з. та частково охоплюють ділянку 12-го і 13-го повторів, визначено, що він містить Ki-мотив (KELF), який найчастіше є епітопом впізнавання комерційних антитіл. Методом ІФА показано наявність антитіл проти цього фрагмента Ki-67 у пацієнтів з іншими типами раку [1].

З літератури відомо, що в гетерохроматині ядер клітин під час G1 фази Ki-67 асоційований з сателітною ДНК. Аналіз нуклеотидної послідовності кДНК імуногенного фрагмента не виявив будь-яких ДНК-зв'язувальних мотивів, однак внаслідок дослідження зазначеної послідовності з використанням бази даних UniProt знайдено гомологію з екзонуклеазою V gamma. Це спонукало нас зв'язувати, чи буде одержаний нами рекомбінантний фрагмент взаємодіяти з ДНК різного походження. Для цього плазмідну ДНК (pET28a) і ДНК сперми лосося аналізували за допомогою імунодот-блот-гібридизації. Обидві ДНК іммобілізували на нітроцелюлозній мембрані, блокували розчином

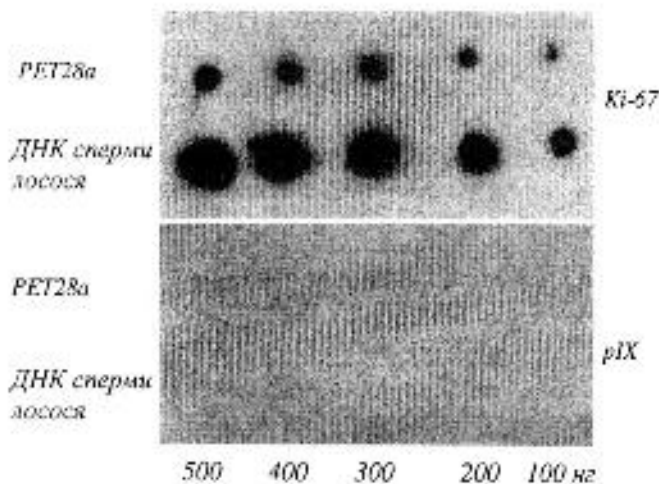


Рис. 1. ДНК зв'язувальна активність фрагмента Ki-67

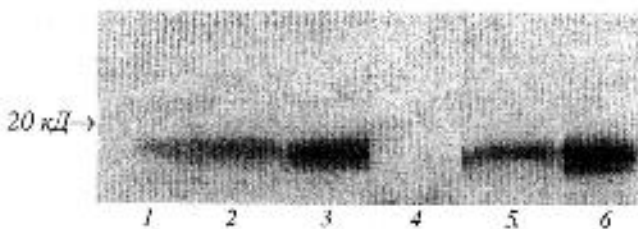


Рис. 2. Вестерн-блот-аналіз монокліональних антитіл проти рекомбінантного фрагмента Ki-67: 1–6 — клони гібридом

знежиреного молока та інкубували її з Ki-67 антигеном. Як контроль проводили інкубацію з рІХ білком, що також містив His-tag. Білки, які взаємодіяли з ДНК, ідентифікували за допомогою монокліональних антитіл проти His-tag методом ECL.

Згідно з даними, представленими на рис. 1, видно, що взаємодія спостерігається лише у разі Ki-67, але не рІХ, причому білок зв'язувався з геномною ДНК набагато ефективніше, ніж з плазмідною. Одержані результати підтверджують наявність ДНК-зв'язувальної активності Ki-67. Більш точна локалізація ділянок білка і ДНК, які вступають у взаємодію, потребує подальших досліджень, які зможуть допомогти розумінню ще й досі невідомої функції Ki-67.

Свідченням на користь наших даних стосовно можливої взаємодії Ki-67 з геномною ДНК є робота [9], де показано, що інтенсивність забарвлення Ki-67 у ядрах клітин при гістохімічних дослідженнях знижувалася при попередній обробці препаратів ДНКазою, але не РНКазою. При цьому у ядерці інтенсивність забарвлення не змінювалась.

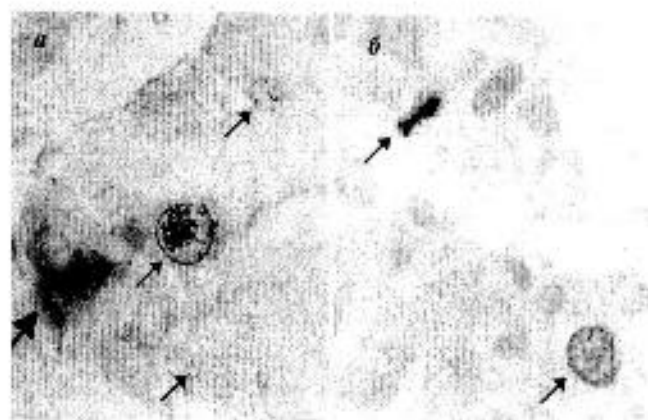


Рис. 3. Виявлення Ki-67 за допомогою методу імуногістохімії у клітинах раку молочної залози людини: а — при використанні полікліональних мишачих антитіл (Ki-67 виявляється в цитоплазмі (жирна стрілка) та в ядрах (показано стрілками) деяких пухлинних клітин); б — із застосуванням монокліональних (клони 1 і 6) антитіл (Ki-67 спостерігається переважно в ядрах пухлинних клітин (показано стрілками). Окуляр — $\times 2,5$; об'єтив — $\times 100$

Автори роблять висновок про важливість контактів між Ki-67 та нуклеїновими кислотами в процесі транскрипції при проліферації клітин.

Відомо також, що видалення Ki-67 за допомогою антисенс-нуклеотидів веде до зупинки проліферації клітин, що свідчить про його суттєву роль в цьому процесі.

Надалі високоочищений рекомбінантний фрагмент Ki-67 використано для одержання полі- і монокліональних антитіл. Імунізацію мишей лінії BALB/c та перевірку титру сироватки імунних тварин і культуральних середовищ гібридомних клітин здійснювали за раніше описаною методикою [7]. При первинному скринінгу одержано шість позитивних клонів, які розпізнавали антиген з використанням методу ELISA. Антитіла лише п'яти клонів реагували на денатурований фрагмент Ki-67 в умовах Вестерн-блот-аналізу (рис. 2). При перевірці одержаних клонів на можливість використання їх для гістохімічних досліджень, а саме — для виявлення субклітинної локалізації у злоякісних пухлинах аденокарциноми молочної залози людини з'ясувалося, що антитіла лише двох клонів (1 і 6) здатні розпізнавати Ki-67 при гістохімічному аналізі. З наведених на рис. 3 даних видно, що і полі-, і монокліональні антитіла ефективно розпізнають антиген в ядрах клітин, які знаходяться на стадії поділу. Це засвідчує яскраво виражена конденсація ядерного хроматину. Крім того, монокліональні антитіла розпізнають Ki-67 антиген як у

структурах, що дуже нагадують ядрця, так і в структурах з метафазними пластинками хромосом. Останнє збігається з літературними даними, оскільки вважається, що Ki-67 спочатку акумулюється в ядрцях, а потім транслокується в перихромосомний шар протягом мітозу.

Таким чином, нами отримано високоспецифічні полі- і моноклональні антитіла проти Ki-67 антигену, які можна ефективно застосовувати для визначення рівня експресії Ki-67 білка імуногістохімічними методами і відповідно рівня проліферації злоякісних пухлин. Окрім цього, наші результати підтверджують гіпотезу про ДНК-зв'язувальні властивості Ki-67 білка.

I. O. Tykhonkova, V. V. Lisogubov, Yu. V. Khozhaenko, O. O. Dovgopola, S. I. Korovin, G. V. Ovcharenko, V. S. Usenko, M. V. Rodnin, V. V. Filonenko

Investigation of some structural-functional peculiarities of the immunogenic fragment Ki-67 antigen. Generation of polyclonal and monoclonal antibodies to Ki-67

Summary

The study of tumor-associated antigens function is a prerequisite for understanding the molecular mechanisms of oncogenesis. Earlier we have determined the nuclear protein Ki-67 as an autoantigen in human melanoma. cDNA of immunogenic fragment of Ki-67 has been cloned into pET23d vector and expressed in bacterial cells. The recombinant fragment of Ki-67 has been purified from the bacterial cell lysate has been used as an antigen for the production of polyclonal and monoclonal antibodies with following detection of Ki-67 in Breast adenocarcinomas. We have shown by the immunodot-blot analysis that the 18 kDa recombinant fragment of Ki-67 possesses a DNA-binding activity.

Key words: Ki-67 antigen, antibodies, DNA-binding activity, immunohistochemistry

И. О. Тихонкова, В. В. Лизогубов, Ю. В. Хожаенко, О. О. Довгополая, С. И. Коровин, Г. В. Овчаренко, В. С. Усенко, Н. В. Роднин, В. В. Филоненко

Исследование структурно-функциональных свойств иммуногенного фрагмента Ki-67 антигена и получение к нему поли- и моноклональных антител

Резюме

Исследование особенностей функционирования ассоциированных с опухолью антигенов дает возможность расширить

представления о молекулярных механизмах онкогенеза. Ранее нами идентифицирован ядерный белок Ki-67 как один из аутоантигенов меланомы человека, а кДНК иммуногенного фрагмента Ki-67 антигена клонирована в pET23d вектор и экспрессирована в клетках бактерий. В представленной работе рекомбинантный пептид Ki-67, очищенный из лизатов клеток бактерий, использован как антиген для получения поли- и моноклональных антител. Выделенные антитела применены для определения локализации Ki-67 антигена в клетках аденокарциномы молочной железы. Методом иммунодот-блот-анализа установлено, что полученный рекомбинантный фрагмент Ki-67 антигена размером 18 кДа обладает ДНК-связывающими свойствами.

Ключевые слова: белок Ki-67, антитела, иммуногистохимия, ДНК-связывающая активность

PERELIK LITERATURY

1. Роднин М. В., Тихонкова И. О., Филоненко В. В., Дробот Л. Б., Мацука Г. Х., Гут И. Т. Пошук та характеристика антигенів меланоми за допомогою методу серологічної ідентифікації рекомбінантно експресованих антигенів // Биополимеры и клетка.—2000.—16, № 5.—С. 339—344.
2. Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation // Int. J. Cancer.—1983.—31.—P. 13—20.
3. Gerdes J., Becker M. H. G., Key G., Cattoretti G. Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues // J. Pathol.—1992.—168.—P. 85—86.
4. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown // J. Cell. Physiol.—2000.—183.—P. 311—322.
5. Sawhney N., Hall P. Ki-67-structure, function, and new antibodies // J. Pathol. Physiol.—1992.—168.—P. 161—2.
6. Brown D. C., Gatter K. C. Ki-67 protein: the immaculate deception? // Histopathology.—2002.—40.—P. 2—11.
7. Погребний П. В., Кухаренко О. П., Тихонкова И. О., Пальчевський С. С., Савінська Л. О., Погрібна А. П., Вальовка Т. Й., Маркєєва Н. В., Солдаткіна М. А., Мацука Г. Х., Гут І. Т., Філоненко В. В. Одержання та характеристика моноклональних антитіл проти p70S6-кінази α // Експерим. онкологія.—1999.—21.—P. 232—238.
8. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227.—P. 680—685.
9. Szekeres G., Le Tourneau A., Benfars J., Audouin J., Diebold J. Effect of ribonuclease A and deoxyribonuclease I on immunostaining of Ki-67 in fixed-embedded sections // Pathol. Res. Pract.—1995.—191.—P. 52—56.

УДК 577.155.2

Надійшла до редакції 03.06.04