

УДК 577.21; 577.12

ДНК-ВАКЦИНА, КОДИРУЮЩАЯ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН И СИГНАЛ ДЕГРАДАЦИИ ОРНИТИНДЕКАРБОКСИЛАЗЫ, СУЩЕСТВЕННО ЗАМЕДЛЯЕТ РОСТ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ У МЫШЕЙ

© 2012 г. А. В. Морозов^{1*}, В. А. Морозов², Т. М. Астахова³,
А. В. Тимофеев¹, В. Л. Карпов¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва 119991, Россия

²Robert Koch Institute, Berlin 13353, Germany

³Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва 119334, Россия

Поступила в редакцию 21.11.2011 г.

Принята к печати 06.12.2011 г.

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) – наиболее распространенная первичная злокачественная опухоль печени. Существующие методы терапии ГЦК малоэффективны, а их применение имеет значительные ограничения. Недавно было показано, что ДНК-вакцины, кодирующие маркер ГЦК – альфа-фетопротейн, способны вызывать иммунный ответ против этого аутоантигена *in vivo*. Однако использованные в качестве вакцин векторы не обеспечивали необходимой защиты, а стратегии иммунизации были достаточно сложными. Ранее мы показали, что ДНК-вакцина, кодирующая обратную транскриптазу вируса иммунодефицита человека с сигналом деградации (дегроном) орнитиндекарбоксилазы на С-конце, способствовала развитию у мышей специфического клеточного иммунного ответа против обратной транскриптазы. В представленной работе получены векторы, кодирующие альфа-фетопротейн, а также альфа-фетопротейн с сигналом деградации орнитиндекарбоксилазы. Выявлена эффективная экспрессия и быстрая и направленная деградация рекомбинантного альфа-фетопротейна в протеасомах трансфицированных клеток. Показана стимуляция противоопухолевого иммунного ответа и существенное замедление роста ГЦК у вакцинированных животных.

Ключевые слова: гепатоцеллюлярная карцинома, альфа-фетопротейн, ДНК-вакцина, орнитиндекарбоксилаза.

DNA VACCINE ENCODING ALPHA-FETOPROTEIN WITH FUSED ORNITHINE DECARBOXYLASE DEGRADATION SIGNAL SIGNIFICANTLY SUPPRESSES HEPATOCELLULAR CARCINOMA GROWTH IN MICE, by A. V. Morozov^{1*}, V. A. Morozov², T. M. Astakhova³, A. V. Timofeev¹, V. L. Karpov¹ (¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia, *e-mail: Runkel@inbox.ru, Runkel10@gmail.com; ²Robert Koch Institute, Berlin, 13353 Germany, ³Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia). Hepatocellular carcinoma (HCC) is among the most frequent malignancies in humans. HCC therapy is not efficient and the usual outcome is poor. In this regard, novel approaches to treat and prevent HCC are urgently needed. The Alpha-fetoprotein (AFP) is a serological marker of HCC. Recently it has been shown, that the DNA vaccines expressing AFP are capable in generating immune response against AFP. However, both, the immunization procedures and DNA vaccines used before were complex and not always very effective. We have shown that DNA vaccine encoding HIV-1 reverse transcriptase (RT) with fused ornithine decarboxylase (ODC) degradation signal induced a strong Th-1 immune response against RT in mice. Using this approach we designed a set of novel DNA vaccines bearing AFP and ODC degradation signal. Results obtained on transfected cells demonstrated efficient expression and fast proteasomal degradation of the recombinant AFP. The anti-tumor immune response stimulation was shown in immunized animals and most importantly a notable retardation of tumor growth was observed as a result of protective vaccination.

Keywords: hepatocellular carcinoma, alpha-fetoprotein, DNA vaccine, ornithine decarboxylase.

Принятые сокращения: АФП – альфа-фетопротейн; ФБ – фосфатный буфер; ФБХ – фосфатный буфер, содержащий 1% глицина и 0.1% Triton X-100; ИФА – иммуноферментный анализ; ОДК – орнитиндекарбоксилаза; ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты; FITC – флуоресцеинизотиоцианат, TRITC – тетраметилродаминозотиоцианат; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

* Эл. почта: Runkel@inbox.ru; Runkel10@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) — одна из высокозлокачественных опухолей, которая образуется из гепатоцитов и может расти в виде одиночного или множественных узлов, а также активно метастазировать в другие органы. Опухоль чаще развивается у больных циррозом и распространена в регионах, где встречаются гепатиты В и С. Смертность от ГЦК в мире составляет около 662 000 человек в год [1]. Частота ГЦК у мужчин — 13.6 на 100 000 (пятое место среди других форм рака). У женщин этот показатель равен 5.52 на 100 000 (восьмое место среди других форм рака) [2]. В России частота ГЦК доходит до 1–5 случаев на 100 000 населения в год.

При ГЦК проводят частичную или полную гепатэктомию с последующей трансплантацией печени, а также применяют химиотерапию. К сожалению, однозначно положительного эффекта ни один из этих методов не дает, у каждого есть существенные ограничения, а их применение лишь незначительно продлевает жизнь больного. Поэтому проблема поиска новых подходов к терапии ГЦК крайне актуальна.

Одна из особенностей ГЦК — частая (до 80% случаев) экспрессия опухолевыми клетками альфа-фетопротеина (АФП). АФП — белок сыворотки крови эмбриона млекопитающих и человека. Он продуцируется желточным мешком и эмбриональной печенью, вскоре после рождения концентрация АФП в крови снижается до нескольких нг/мл. Однако АФП появляется в значительных количествах (мкг/мл) в крови взрослого организма при развитии злокачественных новообразований печени и некоторых опухолей репродуктивной системы [3–8], поэтому АФП служит маркером ГЦК и в то же время может использоваться в качестве мишени для противоопухолевой иммунотерапии.

Предпосылкой к созданию эффективной противоопухолевой вакцины на основе АФП служит возможность активации иммунного ответа против этого аутоантигена. Показано, что популяция лимфоцитов, распознающих эпитопы АФП, не элиминируется в эмбриогенезе, а продолжает циркулировать в крови взрослых особей на протяжении всей жизни [9, 10]. При этом такие лимфоциты отличаются неактивным (пассивным) состоянием, однако, они могут активироваться антигенными эпитопами АФП. Более того, в структуре АФП выделены иммунодоминантные [10, 12] и субдоминантные районы [11]. В этой связи было предложено использовать в терапии ГЦК пептиды, соответствующие иммунодоминантным областям АФП [12, 13]. При помощи этого подхода выявлены различия в иммунном ответе разных индивидов на эпитопы АФП. Кроме того, было высказано предположение, что бо-

лее сильный иммунный ответ против АФП возникает при иммунизации не пептидами, а полноразмерным белком [10, 14]. При разработке подходов к терапии опухолей предпочтение отдается стимуляции клеточного иммунного ответа, чего, как правило, не удается добиться вакцинацией полноразмерным белком или его пептидами, так как такая иммунизация часто приводит к развитию гуморального (Th2) иммунного ответа против белка-мишени. Напротив, для получения сильного клеточного (Th1) иммунного ответа против АФП необходимо обеспечить его синтез в антигенпредставляющих клетках, а также его протеасомную деградацию, что повлияет на презентацию пептидов АФП молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) класса I и в дальнейшем простимулирует активацию специфических цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ). Одним из подходов к решению этой проблемы может быть использование ДНК-вакцин. Работы по созданию ДНК-вакцин, кодирующих АФП, проводятся в течение последних 10 лет [15–21], однако их результаты говорят о необходимости совершенствования как самих вакцин, так и подходов к иммунизации.

В представленной работе нами предложена новая стратегия создания ДНК-вакцины против ГЦК. Получены генно-инженерные конструкции, кодирующие АФП с коротким сигналом деградации орнитиндекарбоксилазы (ОДК), который обеспечивает быструю деградацию рекомбинантного белка в протеасомах [22]. Тем самым созданы условия для презентации пептидов АФП в комплексе с молекулами ГКГ класса I, что привело к активации специфического иммунного ответа и способствовало замедлению роста ГЦК у вакцинированных животных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. Использовали мышей линии С57Bl/6 в возрасте 8–9 недель, полученных из питомника лабораторных животных “Столбовая”. Животных содержали в виварии Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН согласно этическим нормам содержания лабораторных животных.

Клеточные линии. В работе использовали клеточные линии НЕК 293 Т (эпителиальные клетки почки эмбриона человека, ATCC, Manassas, VA no. CRL-1573); TZM-bl (генетически модифицированная линия клеток HeLa аденокарциномы шейки матки человека, AIDS Reaserch and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, no. 8129); Hepa 1-6 (клетки гепатомы мыши, ATCC, Manassas, VA no. CRL-1830). Клетки всех линий культивировали в среде DMEM (“PanEco”, Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (“Hi

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
SacIafpF	ATT TGA AGG AGC TCG CAG CCA TGA AGT G
XhoIafpR	CAC ACC AAA GAC TCG AGA CAT TTT TTT GTC C
NheIafpR	CTT CTG GAG ATG TGC TAG CGC CCA AAG
F1	GGT CTA TAT ATC TAG AGC TCG CAG CCA TGA AGT G
R1	GTG GTG GTA CCG CTA CTC GAG CAC ATT GAT CCT AG
R2	CTC GAG ACA TTT TTT TGT CCA CGG TAC CTG GAG
Fd	CAT TTC GCT GCG TCT AGA ATG TTG CAC GAA AAT G
Rd	GAC TTA GCT TAA TAA TGG TTG TTG CCT G
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
Afp1	GAG TTT GGG ATA GCT TCC ACG TTA G
Afp2	GCA TGT ATG TTC AGT GAT AAG
Afp3	TCC ACG TGC TGC CAG CTC AGC G
BGHr	TAG AAG GCA CAG TCG AGG
pCMVseqF	CCA TTG ACG TCA ATG GGA GTT TG
pCMVseqR	GAA TTC GGT TGA AGC TAC AAA ATG

clone”, США), 2 mM *L*-глутамин (“PanEco”) и антибиотики (пенициллин/стрептомицин), при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности. Клетки Нера 1-6 перед введением животным снимали со дна флакона с помощью раствора трипсина/EDTA, а затем отмывали 5 раз фосфатным буфером (ФБ).

Векторы. Конструирование вектора rAFP. Полноразмерный ген, кодирующий АФП мыши (*maf*p, 1.8 т.п.н.), амплифицировали с плазмиды p_{al16}AFP Evrogen (“Evrogen”, Россия). Для ПЦР использовали короткие олигонуклеотиды (праймеры) SacIafpF и XhoIafpR (табл. 1), содержащие сайты рестрикции эндонуклеаз SacI и XhoI соответственно. Реакцию проводили в амплификаторе Bio-Rad Q-Cycler (“Bio-Rad”, США).

Амплифицированный фрагмент *maf*p вырезали из геля и очищали с помощью Promega Wizard Gel Extraction kit (“Promega”) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Очищенный амплимер расщепляли эндонуклеазами SacI и XhoI (обе “Fermentas”, Литва) в течение 1 ч при 37°C, анализировали полученные фрагменты в 1%-м агарозном геле и очищали, используя набор Promega Wizard Gel Extraction kit.

Инкубацией с эндонуклеазами SacI и XhoI (“Fermentas”) из конструкции pCMV_{RTODC}signal [22] вырезали вставку – *RTODC*signal. Обработанную таким образом плазмиду pCMV анализировали в 1%-м агарозном геле/ТАЕ и очищали с помощью набора Promega Wizard Gel Extraction kit согласно рекомендациям производителя. Фрагмент *maf*p встраивали по сайтам SacI–XhoI в расщепленную плазмиду pCMV с помощью Т4-ДНК-лигазы (“Fermentas”) при 14°C в течение ночи. Компетентные клетки DH5-α трансформи-

ровали лигазной смесью: 1 ч на льду, затем 45 с теплового шока (42°C), после чего инкубировали в течение 2 мин во льду и наносили на чашки Петри (“Corning”, США) с агаром, содержащим ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. На следующий день выросшие колонии переносили в 5 мл среды LB (“Sigma-Aldrich”, Германия) и амплифицировали в течение ночи. На следующий день плазмиды выделяли с помощью набора Qiagen Plasmid Mini Kit (“Qiagen”) согласно протоколу фирмы-производителя. Присутствие вставок в клонх проверили с использованием эндонуклеаз SacI, XhoI (1 ч при 37°C) и анализа в 2%-м агарозном геле/ТАЕ. Положительные клоны названы pCMVAFP. Правильность нуклеотидной последовательности вставки подтверждали секвенированием плазмид с праймерами pCMVseqF и pCMVseqR (табл. 1). Праймеры F1 и R2 (табл. 1), содержащие сайты рестрикции эндонуклеаз XbaI и KpnI, соответственно, использовали для амплификации *maf*p с плазмиды pCMVAFP. ПЦР, а также очистку полученного фрагмента выполняли как описано ранее. Амплимер затем инкубировали с XbaI, KpnI и очищали из 1%-го агарозного геля/ТАЕ.

Вектор pCDNA3.1(-) (“Invitrogen”) обрабатывали эндонуклеазами XbaI, KpnI при 37°C и очищали из 1%-го агарозного геля/ТАЕ как описано ранее. Затем по сайтам XbaI–KpnI *maf*p лигировали в pCDNA3.1(-). После трансформации клеток DH5-α и дальнейшей амплификации клонов, а также клональной селекции (рестрикция эндонуклеазой HindIII с последующим электрофорезом в 1%-м агарозном геле/ТАЕ), получили вектор rAFP. Сохранение рамки считывания и пра-

вильность нуклеотидной последовательности конструкции подтверждали секвенированием с праймерами T7, Afp1, Afp2, Afp3, BGNr (табл. 1).

Конструирование вектора pAFPODCsignal. С целью обеспечения протеасомной деградации рекомбинантного AFP получили вектор, содержащий ген *mafp* в одной рамке считывания с деградом ОДК. Полноразмерный ген *mafp* амплифицирован с конструкции p Δ 16AFP при использовании праймеров SacIafpF и NheIafpR (табл. 1), содержащих сайты рестрикции эндонуклеаз SacI и NheI соответственно. ПЦР-продукт анализировали в 1%-м агарозном геле в буфере TAE. Амплифицированный фрагмент *mafp* вырезали из геля и очищали с помощью Promega Wizard Gel Extraction kit ("Promega") согласно рекомендациям производителя. Очищенный фрагмент инкубировали с эндонуклеазами SacI и NheI в течение 1 ч при 37°C, а затем очищали из 1%-го агарозного геля с использованием набора Promega Wizard Gel Extraction kit. Рестрикцией эндонуклеазами SacI и NheI (2 ч, 37°C) из конструкции pCMVRTODCsignal был удален ген *rt* (RT). Обработанную ферментами плазмиду анализировали в 1%-м агарозном геле/TAE и очищали с помощью набора Promega Wizard Gel Extraction kit согласно протоколу фирмы-производителя. Фрагмент *mafp* по сайтам SacI–NheI лигировали в плазмиду с помощью T4-ДНК-лигазы ("Fermentas") при 14°C в течение ночи. Трансформацию компетентных клеток DH5- α лигазной смесью и амплификацию клонов проводили как описано выше. Присутствие вставки в клоне проверяли с помощью обработки эндонуклеазами SacI и NheI (1 ч при 37°C) и анализа в 2%-м агарозном геле/TAE. Клоны, содержащие нужные вставки, названы pCMVAFPODCsignal. Нуклеотидная последовательность плазмиды подтверждена секвенированием с использованием праймеров pCMVseqF и pCMVseqR (табл. 1).

Затем для амплификации *AFPODCsignal* с плазмиды pCMVAFPODCsignal использовали праймеры F1 и R1 (табл. 1), содержащие сайты рестрикции эндонуклеаз XbaI и KpnI соответственно. ПЦР, а также очистку полученного фрагмента выполняли как описано ранее. Амплимер инкубировали с рестриктазами XbaI и KpnI и очищали из 1%-го агарозного геля/TAE.

Вектор pCDNA3.1(-) ("Invitrogen") обрабатывали эндонуклеазами XbaI и KpnI при 37°C и очищали из 1%-го агарозного геля/TAE. В результате лигирования *AFPODCsignal* в pCDNA3.1(-) по сайтам XbaI–KpnI, последующей трансформации клеток DH5- α , дальнейшей амплификации клонов, а также клональной селекции (рестрикция эндонуклеазой HindIII с последующим электрофорезом в 1%-м агарозном геле/TAE) получен вектор pAFPODCsignal. Правильность нуклео-

тидной последовательности конструкции подтверждена секвенированием с праймерами T7, Afp1, Afp2, Afp3, BGNr (табл. 1).

Создание плазмид p Δ AFP и p Δ AFPODCsignal. Для того чтобы исключить секрецию рекомбинантных белков, получили два вектора с делецией последовательности, кодирующей сигнал экспорта (54 п.н.), на 5'-конце гена *mafp*. С этой целью использовали праймеры Fd и Rd со встроенными сайтами рестрикции эндонуклеаз XbaI и BamHI соответственно (табл. 1). Короткие фрагменты 5'-концевой области гена *mafp* амплифицировали с плазмиды pAFP и получили амплимеры, не кодирующие сигнал экспорта. ПЦР-продукт анализировали в агарозном геле.

Амплифицированный фрагмент вырезали из геля и очищали с помощью Promega Wizard Gel Extraction kit. Очищенный фрагмент обрабатывали эндонуклеазами XbaI и BamHI (1 ч при 37°C) и очищали из 2%-го агарозного геля при помощи Promega Wizard Gel Extraction kit.

Плазмиды pAFP и pAFPODCsignal инкубировали с ферментами XbaI и BamHI в одинаковых условиях (37°C, 2 ч). При этом был удален 5'-концевой фрагмент гена *mafp*, содержащий сигнал экспорта. Обработанные плазмиды очищали из 1%-го агарозного геля как описано ранее.

5'-Концевые фрагменты *mafp*, не содержащие последовательности, кодирующей сигнал экспорта, лигировали с помощью T4-ДНК-лигазы в подготовленные (раскрытые) на предыдущем этапе векторы pAFP и pAFPODCsignal по сайтам XbaI–BamHI. Лигирование, трансфекцию компетентных клеток, амплификацию и отбор положительных клонов проводили как описано выше. Плазмиды выделяли с помощью набора Qiagen Plasmid Mini Kit ("Qiagen", "Hilden", Германия) согласно инструкциям производителя. Селекция клонов (рестрикция эндонуклеазой HindIII с последующим электрофорезом в 2%-м агарозном геле/TAE) позволила отобрать клоны со вставкой подходящего размера. В результате получили векторы p Δ AFP [23] и p Δ AFPODCsignal. Правильность нуклеотидной последовательности конструкций подтверждали секвенированием с праймерами T7, Afp1, Afp2, Afp3, BGNr (табл. 1).

Трансфекция. Для трансфекции клеток линий HEK293 T и TZM-bl использовали Mirus TransIT-LT1 reagent ("Mirus Bio", США) согласно инструкциям производителя.

Через 48 ч после трансфекции клетки отмывали 3 раза ФБ (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.0115% Na₂HPO₄ · 7H₂O, 0.02% KH₂PO₄, pH 7.5), после чего снимали и переносили в стерильную пластиковую пробирку и отмывали еще 2 раза ФБ. Клетки лизировали в течение 10 мин на льду лизирующим буфером (50 мМ Трис-НCl, pH 8.0, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 5 мМ EDTA), содержащим ин-

гибитор протеолиза Complete (“Roche”, Германия), центрифугировали (10000 об/мин, 10 мин) и собирали надосадочную жидкость. Лизаты хранили при температуре -70°C .

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). Лизаты трансфицированных клеток анализировали в денатурирующем (ДСН) градиентном (4–20%) Трис-глицин ПААГ (ДСН ПААГ) Invitrogen Novex Tris-Glycine Gel (“Invitrogen”). С этой целью использовали Tris-Glycine Sample Buffer и Tris-Glycine Running Buffer согласно протоколу производителя. Проводили также электрофорез в неденатурирующих условиях (нативный ПААГ) с использованием Tris-Glycine Native Sample Buffer и Tris-Glycine Native Running Buffer согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (“Bio-Rad”), используя Tris-Glycine Transfer Buffer (“Invitrogen”), содержащий 20% метанола. Эффективность переноса оценивали, окрашивая мембраны 0.1%-м раствором Ponceau Rouge (“Sigma-Aldrich”).

Вестерн-блотинг. Мембраны инкубировали с поликлональными антителами кролика против АФП (“Abcam”, США) в течение 1 ч 30 мин, затем отмывали и инкубировали с антителами козы против IgG кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (“Dako”, Дания). Блоты проявляли с помощью набора ECL (“GE Healthcare”, Великобритания). Для нормирования сигнала мембраны отмывали от антител буфером для снятия антител (ФБ, 2% ДСН, 7 мкл/1 мл β -меркаптоэтанол), после чего еще раз отмывали в ФБ. Мембраны инкубировали с моноклональными антителами мыши против β -актина (“Sigma-Aldrich”) или против тубулина (“Dako”), затем отмывали и инкубировали с антителами кролика против IgG мыши, меченными пероксидазой хрена (“Dako”). Мембраны проявляли как описано ранее.

Анализ культуральной жидкости трансфицированных клеток. После трансфекции клетки НЕК293 Т переводили на среду с искусственным заменителем сыворотки Lifor (“Lifor-acell”, США). Через 48 ч после трансфекции культуральную жидкость собирали, центрифугировали при комнатной температуре (5 мин, 3000 об/мин, затем 10 мин при 10000 об/мин), после чего культуральную жидкость фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм (“Schiecher and Schuell”, Германия) и концентрировали, используя колонки Vivaspin $\Delta 30$ кДа (“Sartorius”, США). Присутствие АФП в культуральной жидкости определяли с помощью ДСН-ПААГ и Вестерн-блотинга как описано ранее.

Протеасомную деградацию рекомбинантных белков и их стабильность изучали с помощью ингибитора протеасом MG132 (“Sigma-Aldrich”). Через 30 ч после трансфекции в культуральную

жидкость клеток добавляли ингибитор MG132 (5 мкМ) и инкубировали в течение 18 ч. После этого клетки лизировали, белковые лизаты анализировали в ДСН-ПААГ, а присутствие АФП и АФП-содержащих химер оценивали с помощью Вестерн-блотинга.

Стабильность рекомбинантных белков в клетках и период их полураспада определяли с использованием метода ингибирования трансляции циклогексимидом. Через 48 ч после трансфекции в культуральную жидкость клеток добавляли циклогексимид (100 мкг/мл, “Sigma-Aldrich”). Сразу после добавления ингибитора, а затем через 2, 4, 6 ч клетки снимали и лизировали как описано ранее. Клеточные лизаты анализировали в ДСН-ПААГ и с помощью Вестерн-блотинга.

Иммунофлуоресценция. Спустя 48 ч после трансфекции клетки НЕК293 Т отмывали ФБ и фиксировали в течение 10 мин охлажденным (-20°C) раствором метанол : ацетон в соотношении 1 : 1, затем просушивали в течение 2 мин при комнатной температуре. После чего клетки инкубировали в фосфатном буфере (5 мин), затем в течение 2–10 мин в растворе, содержащем 0.5% Triton X-100. Клетки отмывали 3 раза ФБ и оставляли в буфере ФБХ (ФБ, 1% глицина, 0.1% Triton X-100) на 30 мин, после чего инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (или 12 ч при 4°C в темноте) с антителами кролика против АФП (“Abcam”, США), разведенными в буфере ФБХ в соотношении 1 : 200. Клетки промывали 3 раза ФБ, содержащим 0.1% Triton X-100, и окрашивали антителами козы против IgG кролика, меченными Texas red (“Dako”, “Glostrup”, Дания), разведенными (1 : 200) в буфере: ФБХ. Затем инкубировали в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре, после чего отмывали 3 раза в ФБХ и еще 3 раза в ФБ. Фотографии флуоресцирующих белков, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axioplan 2 (“Carl Zeiss”, Германия), обрабатывали с использованием программы “LSM 5 Image Examiner” (“Carl Zeiss”).

Анализ скорости деградации АФП с помощью иммунофлуоресценции. Через 48 ч после трансфекции клетки НЕК293 Т обрабатывали циклогексимидом (как описано ранее) и через 2, 4 и 6 ч после добавления ингибитора определяли внутриклеточную локализацию рекомбинантных белков с помощью иммунофлуоресценции.

Двойная иммунофлуоресценция. Эпителиальные клетки TZM-bl через 48 ч после трансфекции плазмидами отмывали ФБ и фиксировали в течение 15 мин 3%-м раствором параформальдегида (ПФА) (“Sigma-Aldrich”). Затем клетки последовательно промывали 3 раза ФБ, обрабатывали ФБ, содержащим 0.5% Triton X-100 (2–10 мин), промывали 3 раза ФБ и инкубировали (1 ч при комнатной температуре) в ФБХ. После этих про-

цедур клетки инкубировали (1 ч, 4°C в темноте) с антителами кролика против АФП (“Abscam”), разведенными в соотношении 1 : 200, а также с антителами мыши против кальнексина (“Gene Tex”, США), разведенными в том же буфере (1 : 200). Клетки промывали 3 раза ФБ, содержащим 0.1% Triton X-100, и окрашивали антителами козы против IgG кролика, меченными FITC (“Dako”), разведенными (1 : 200) в ФБХ. Инкубировали в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре, затем промывали 3 раза ФБ, содержащим 0.1% Triton X-100, и окрашивали антителами козы против IgG мыши, меченными TRITC (“Dako”), разведенными (1 : 200) в ФБХ. Выдерживали в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре, после чего отмывали 3 раза в ФБ с 0.1% Triton X-100 и еще 3 раза в ФБ. Фотографии флуоресцирующих белков получены с помощью флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axioplan 2 (“Carl Zeiss”) с объективом Plan-Apochromat и насадкой LSM 510 для конфокальной микроскопии (“Carl Zeiss”). Фотографии обрабатывали с использованием программы “LSM 5 Image Examiner”.

Создание модели перевиваемой гепатомы у мышей. Мышам (12 самцов линии C57Bl/6, разделенных на три равных группы) подкожно в область холки вводили 4×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 клеток Нера 1-6 в 100 мкл ФБ. Через 35 дней после перевивки опухолевых клеток мышей забивали, собирали сыворотки, измеряли размеры новообразований и отбирали образцы опухолевой ткани и печени животных. Образцы тканей гомогенизировали и лизировали, как описано ранее, после чего тестировали методом Вестерн-блоттинга с антителами против АФП (“Abscam”). Методом Вестерн-блоттинга оценивали также количество АФП в сыворотках животных. Кроме того, еще 20 животных (10 самцов и 10 самок) разделили на четыре группы по пять мышей в каждой. Пяти самцам и пяти самкам вводили по 2×10^5 клеток Нера 1-6 в 100 мкл ФБ, оставшимся 10 животным вводили по 2×10^5 ресуспендированных в ФБ клеток опухолевой ткани, взятой из мыши, которой клетки Нера 1-6 ввели в предыдущем опыте.

Иммуногистохимия. Экспрессию АФП в опухолях, которые развились у мышей, оценивали с помощью иммуногистохимических методов. С этой целью образцы опухолевой ткани фиксировали в течение 2 ч при комнатной температуре в 4%-м растворе ПФА (“Sigma-Aldrich”), инкубировали (16 ч, 10%-й раствор сахарозы), после чего замораживали в парах жидкого азота и хранили при -80°C . С помощью криостата получили срезы ткани толщиной 10 мкм, которые помещали на стекла, покрытые поли-L-лизинном. Стекла инкубировали (1 ч при комнатной температуре) в ФБ, содержащем 0.1% Triton X-100 и 7%-ю сыворотку козы. Затем стекла инкубировали в течение

16 ч с антителами кролика против АФП (“Abscam”), разведенными (1 : 200) в том же буфере, отмывали в течение 10 мин в ФБ и окрашивали (1 ч в темноте) антителами козы против IgG кролика, меченными Alexa 546 (“Invitrogen”), взятыми в разведении 1 : 800. После этого стекла промывали ФБ (2 раза по 10 мин) и окрашивали ядра клеток в течение 15 мин раствором Hoechst (“Invitrogen”) в буфере ФБ, содержащем 0.1% Triton X-100 и 7%-ю сыворотку козы. На последнем этапе стекла промывали ФБ, заключали в мовиол (“Sigma-Aldrich”) и анализировали, используя флуоресцентный микроскоп Carl Zeiss Axioplan 2. Стекла, служившие контролем, первичными антителами не окрашивались.

Иммунизация мышей ДНК-вакцинами. Всего в опытах использовано 114 мышей C57Bl/6 (самцы в возрасте 8–9 нед), которых разделили на три большие группы: “А”, “Б” и “В”, причем в группы “А” и “Б” входило по 48 животных, а в группу “В” — 18.

Для определения влияния ДНК-вакцинации на выработку специфических антител животных из группы “А” дважды, с интервалом в 2 нед, иммунизировали ДНК-вакцинами, после чего забивали и определяли содержание антител против АФП в сыворотках методом иммуноферментного анализа (ИФА). На 96-луночный планшет адсорбировали АФП (5 мкг/мл, ночь, 4°C) (“YO proteins”, Швеция). Планшет отмывали от несвязавшегося антигена, в лунки вносили сыворотки в разведении 1 : 100 (ФБ, содержащий 0.1% Tween 20 (ФБТ)) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Планшет промывали, вносили пероксидазные конъюгаты, специфичные к IgG1 и IgG2a (“US Biological”) мыши, и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После чего отмывали планшет ФБТ от несвязавшихся антител. Иммунные комплексы выявляли с использованием тетраметилбензидина в качестве субстрата. Оптическую плотность (OD) измеряли при длине волны 450 нм. Результат считали положительным, если величина оптической плотности опытного образца была в 2 раза больше, чем в контроле.

В терапевтическом эксперименте использовали мышей группы “Б”. Животным перевивали опухолевую ткань ($\sim 2 \times 10^5$ клеток), ресуспендированную в ФБ. Спустя 2 нед сформировали шесть подгрупп по восемь мышей по принципу равенства среднего объема образовавшихся опухолей. Мышей каждой подгруппы однократно иммунизировали 100 мкг соответствующей плазмиды: pAFP, p Δ AFP, pAFPPODCsignal, p Δ AFPPODCsignal и pcDNA3.1-, а мышам контрольной подгруппы вводили 100 мкл ФБ. Концентрацию плазмид перед иммунизацией доводили с помощью ФБ до 1 мкг/мкл. Плазмиды вводили внутримышечно. После чего в течение 90 дней наблюдали за ростом опухолей у животных и определяли объем

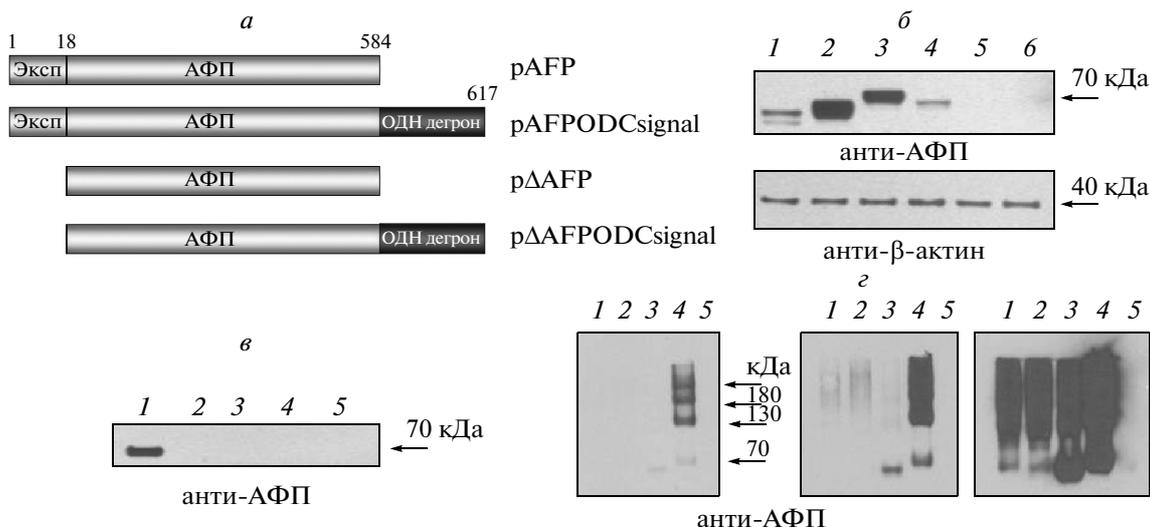


Рис. 1. *a* – Схематическое изображение рекомбинантных белков, синтезирующихся с полученных конструкций. Выделена последовательность АФП мыши. Эксп – сигнал экспорта. ОДК дегрон – сигнал деградации. Номера аминокислотных остатков указаны, начиная с N-конца. *б* – Вестерн-блот-анализ количества рекомбинантных белков в лизатах трансфицированных клеток HEK293 T (А). Клетки трансфицированы: – рΔAFP (1), рAFP (2), рAFPODCsignal (3), рΔAFPODCsignal (4), рСDNA3.1(-) (5). *б* – Лизат нетрансфицированных клеток. Нормирование загрузки белка контролировали с помощью обработки мембраны моноклональными антителами к β-актину (Б). *в* – Сравнительный анализ секреции рекомбинантных белков из трансфицированных клеток. 1 – AFP; 2 – ΔAFP; 3 – AFPODCsignal; 4 – ΔAFPODCsignal; 5 – нетрансфицированные клетки. *г* – Сравнительный анализ олигомеризации рекомбинантных белков в ПААГ без ДСН. Представлены три экспозиции одной и той же мембраны. Лизаты клеток HEK293 T, трансфицированных рΔAFPODCsignal (1), рΔAFP (2), рAFP (3), рAFPODCsignal (4), 5 – нетрансфицированные клетки. Мономеры, димеры, тримеры и тетрамеры указаны стрелками.

неоплазий по формуле $(\text{длина} \times \text{ширина}^2)/2$, когда длина (большой размер) превышала 2 см, использовали формулу $(\text{длина} \times \text{ширина} \times \text{высота})$.

Профилактический эксперимент. Группу “В” разделили на три подгруппы по шесть мышей в каждой. Животных первых двух подгрупп иммунизировали рΔAFPODCsignal и рСDNA3.1- –50 мкг плазмиды, 4 раза с интервалом 2 нед. Мышам контрольной группы вводили ФБ. Спустя 2 нед после последней иммунизации мышам перевивали опухолевую ткань ($\sim 2 \times 10^5$ клеток), ресуспендированную в ФБ, наблюдали за ростом опухолей и определяли объем неоплазий по формулам, описанным выше.

Компьютерные программы. Для анализа нуклеотидных последовательностей и построения физических карт плазмид применяли пакет программ DNASTar: Seqman, EditSeq, MegaAlign, Protean (“Lasergene”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты *in vitro*. Дизайн и создание экспрессионных векторов

Используя в качестве основы коммерческий вектор pAll6AFP и полученный ранее вектор рСMVRTODCsig [22], содержащий ген *rt* (ВИЧ-1) с 3'-концевым сигналом деградации (дегроном)

ОДК (159 п.н.), созданы четыре новые конструкции: рAFP, рAFPODCsignal, рΔAFP, рΔAFPODCsignal (рис. 1*a*). Этапы конструирования этих векторов подробно описаны в Экспериментальной части.

В данной работе исходным был вектор, экспрессирующий полноразмерный AFP (рAFP), остальные три вектора представляли собой его модификации. В частности, для обеспечения протеасомной деградации AFP, синтезируемого с плазмиды рAFP, на 3'-конец гена *mAFP* добавляли последовательность, кодирующую дегрон ОДК (рAFPODCsignal и рΔAFPODCsignal). Для исключения возможной секреции химерных белков из клеток и облегчения их взаимодействия с протеасомой сконструировали два вектора с делетированным сигналом экспорта (54 п.н.) на 5'-конце гена *mAFP*: рΔAFP [23] и рΔAFPODCsignal. Причем вектор рΔAFP задумывался как контрольный для оценки эффективности работы дегрона ОДК в случае рΔAFPODCsignal. Правильная нуклеотидная последовательность всех конструкций подтверждена секвенированием.

Таким образом, созданы четыре генно-инженерные конструкции, среди которых были как контрольные, так и с потенциалом для терапевтического и профилактического использования. Первая часть работы, выполненная *in vitro*, посвящена анализу эффективности экспрессии, секре-

ции, олигомеризации и деградации рекомбинантных белков. Методами непрямой иммунофлуоресценции изучена локализация рекомбинантных белков в трансфицированных клетках.

Экспрессия рекомбинантных белков в трансфицированных клетках

На первом этапе анализа конструкций оценили эффективность экспрессии рекомбинантных белков (AFP, AFPODCsignal, Δ AFP, Δ AFPODCsignal) в трансфицированных клетках НЕК293 Т методом иммуноблотинга. Была выявлена эффективная экспрессия всех рекомбинантных белков, однако уровень экспрессии этих белков в клетках был неодинаков. Больше всего рекомбинантного белка обнаружено в лизатах клеток, трансфицированных векторами pAFP и pAFPODCsignal, несколько меньше – в клетках, трансфицированных p Δ AFP, меньше всего – p Δ AFPODCsignal. Количество нанесенного на ПААГ белка нормировали, используя Вестерн-блоттинг с антителами к β -актину (рис. 1б). Объяснить этот феномен, по-видимому, можно, с одной стороны, присутствием N-концевого сигнала экспорта в белках AFP и AFPODCsignal, способного усиливать экспрессию [23, 24], и активностью C-концевого дегрона ОДК в случае Δ AFPODCsignal, с другой (что может свидетельствовать в пользу его деградации) [22, 25]. Кроме того, появление белков, различающихся по молекулярной массе, в случае p Δ AFP можно объяснить транскрипцией со второго иницирующего кодона в последовательности *mafp*.

Секреция рекомбинантных белков из трансфицированных клеток

На следующем этапе оценили уровень секреции рекомбинантных белков AFP, AFPODCsignal, Δ AFP, Δ AFPODCsignal из трансфицированных клеток. Очевидно, что присутствие ФБС в культуральной среде с большим содержанием (~6.5 мг/мл) альбумина, родственного АФП, препятствует анализу секреции рекомбинантных белков. В этой связи вместо эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота использовали среду, содержащую 10% искусственного заменителя сыворотки Lifo. Спустя 48 ч в после трансфекции культуральную жидкость дважды центрифугировали, фильтровали и концентрировали в 100 раз, после чего анализировали с помощью электрофореза в ПААГ и Вестерн-блоттинга с антителами против АФП. Показано, что единственным секретиремым белком был АФП дикого типа. Следует отметить, что сигнал был настолько сильным, что для эффективного выявления белка методом Вестерн-блоттинга было достаточно скон-

центрировать культуральную жидкость трансфицированных клеток всего в 2–3 раза (рис. 1в).

Секреция только АФП дикого типа указывает на то, что остальные рекомбинантные белки не экспортируются, по-видимому, из-за изменения конформации.

Олигомеризация рекомбинантных белков в клетках

Анализ олигомеризации белков важен для более детального понимания процессов, происходящих в трансфицированной клетке. Его проводят, используя электрофорез в нативном геле (без ДСН и термообработки) и иммуноблоттинг. Известно, что АФП обнаруживается в клетках не только в виде мономеров, но также димеров, тримеров и олигомеров [26, 27]. *A priori* можно ожидать, что олигомеризация влияет (вероятнее всего осложняет) протеасомную деградацию белка, поэтому, чтобы определить степень олигомеризации рекомбинантных белков, анализировали лизаты трансфицированных клеток.

Показано, что димеры, тримеры и даже тетрамеры образуют все рекомбинантные белки, однако наиболее выраженные олигомерные структуры выявлены в лизате клеток, трансфицированных вектором pAFPODCsignal, а наименьшая степень олигомеризации отмечена в клетках, трансфицированных pAFP (рис. 1г).

Период полураспада рекомбинантных белков в клетках

Период полураспада рекомбинантных белков определяли с помощью ингибирования трансляции циклогексимидом. Спустя 48 ч после трансфекции в культуральную жидкость клеток добавляли ингибитор и через 2, 4, 6 ч после этого клетки лизировали и анализировали в ПААГ. Среди рекомбинантных белков наиболее коротким периодом полураспада (1.5–2 ч) обладал Δ AFPODCsignal, при этом Δ AFP и AFPODCsignal были так же стабильны, как АФП дикого типа (как минимум на протяжении 6 ч) (рис. 2а).

Эффективность протеасомной деградации рекомбинантных белков

Протеасома-зависимую деградацию рекомбинантных белков в трансфицированных клетках подтверждали с использованием MG132 – ингибитора активности 26S протеасом. Спустя 30 ч после трансфекции в среду культивирования клеток добавляли MG132 и инкубировали в течение еще 18 ч, после чего клетки лизировали. Лизаты анализировали электрофорезом в ПААГ с последующим иммуноблоттингом.

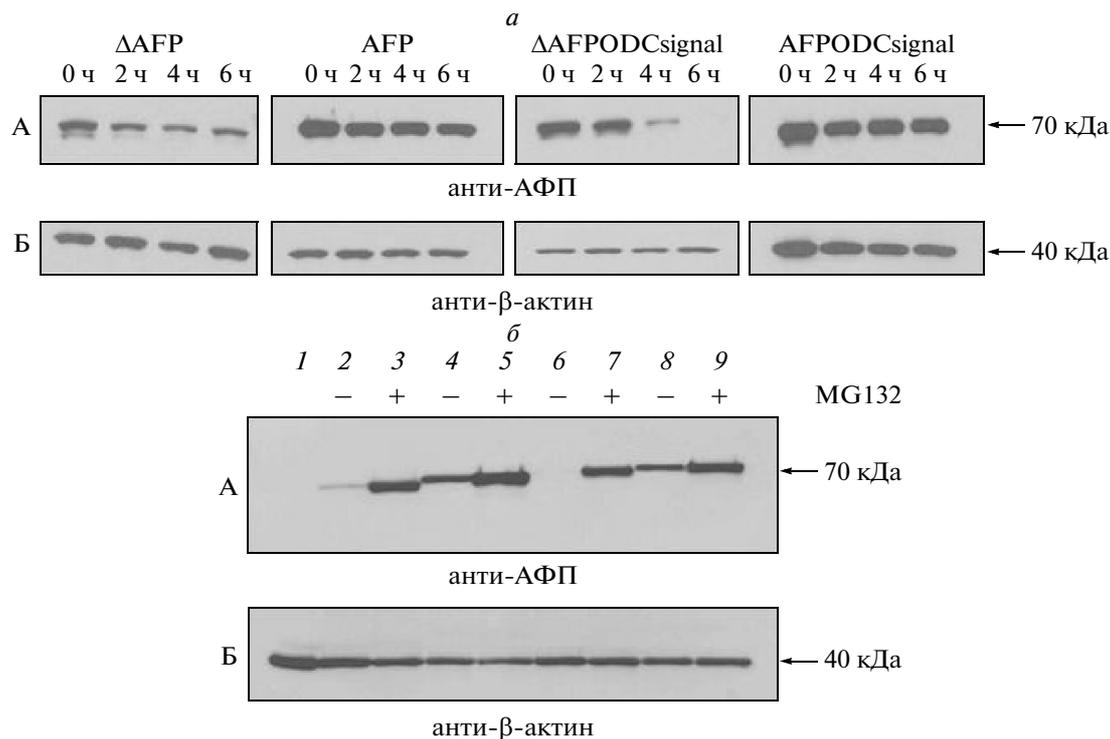


Рис. 2. *а* – Анализ стабильности рекомбинантных белков в трансфицированных клетках в присутствии циклогексимида (А). Для нормирования сигнала мембраны окрашивали антителами против β -актина (Б). *б* – Анализ стабильности рекомбинантных белков в присутствии ингибитора протеасомы MG132 (А). 1 – Лизат нетрансфицированных клеток, 2, 3 – лизаты клеток, трансфицированных рAFP, 4, 5 – лизаты клеток, трансфицированных рAFP, 6, 7 – лизаты клеток, трансфицированных рAFP, 8, 9 – лизаты клеток, трансфицированных рAFPODCsignal. “+” и “-” – присутствие (отсутствие) ингибитора. Для нормирования сигнала мембраны окрашивали антителами против β -актина (Б).

Незначительные расхождения в накоплении белка наблюдали во всех случаях, однако уровень Δ AFPODCsignal и Δ AFP после добавления MG132 был существенно выше, чем в лизатах клеток, культивированных в среде без ингибитора протеасом (рис. 2б). Выявлено низкое количество Δ AFP в лизате трансфицированных клеток, выращенных в среде без ингибитора протеасомы, но, учитывая результаты предыдущего опыта, можно заключить, что деградация этого белка в протеасоме происходит значительно медленнее, чем Δ AFPODCsignal.

Таким образом, результаты двух последних опытов свидетельствуют в пользу того, что среди рекомбинантных белков быстрой и направленной протеасомной деградации подвергается только Δ AFPODCsignal.

Локализация рекомбинантных белков в трансфицированных клетках

Локализацию AFP и полученных на его основе рекомбинантных белков внутри трансфицированных клеток определяли при помощи иммунофлуоресценции. Спустя 48 ч после трансфекции

клетки НЕК293 Т фиксировали и окрашивали сначала антителами против АФП, а затем антителами, конъюгированными с красителем Texas red. Интересно, что белки по-разному локализовались в клетках (рис. 3а). В частности, AFPODCsignal формировал характерные серповидные структуры (рис. 3а, Б); AFP находился преимущественно под поверхностью клеточной мембраны (рис. 3а, А); Δ AFP был диффузно распределен в цитоплазме клеток (рис. 3а, В), а Δ AFPODCsignal присутствовал лишь в следовых количествах (рис. 3а, Г), что хорошо согласуется с результатами иммуноблотинга, представленными на рис. 2а,б.

Мы предприняли попытку отследить динамику образования характерных для AFPODCsignal серповидных структур. Для этого использовали одновременно два метода: ингибирование трансляции циклогексимидом и иммунофлуоресценцию. Через 48 ч после трансфекции в культуральную жидкость клеток вносили циклогексимид. Спустя 2, 4, 6 ч после этого клетки фиксировали и обрабатывали антителами к АФП. В результате показали, что серповидные структуры образуются достаточно быстро, и уже через 4–6 ч они от-

четливо видны в клетках, трансфицированных рAFPODCsignal (рис. 3б).

Весьма вероятно, что серповидные структуры представляют собой скопления олигомеризованного белка.

AFPODCsignal накапливается в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР)

Более точно внутриклеточную локализацию рекомбинантных белков определяли с использованием метода двойной иммунофлуоресценции. Трансфицированные клетки TZM-bl обрабатывали антителами к АФП и параллельно моноклональными антителами, распознающими кальнексин. Кальнексин – это белок (~90 кДа), локализованный преимущественно в ЭПР. Нам удалось показать, что АФР находился в основном в областях, близких к клеточной мембране, и частично в ЭПР (рис. 4а,б). Подобную локализацию АФР можно рассматривать как промежуточный этап в пути его секреции из клетки. Оказалось, что ΔАФР, как показано и ранее, локализовался преимущественно в цитоплазме (рис. 4в). Важно подчеркнуть, что ΔAFPODCsignal в трансфицированных клетках обнаружен лишь в следовых количествах (рис. 4г), по-видимому, из-за эффективной протеасомной деградации. С другой стороны, AFPODCsignal формировал серповидные структуры, которые в большинстве своем локализовались с кальнексином, что свидетельствует об их расположении в ЭПР (рис. 4д,е). Таким образом, AFPODCsignal накапливался в ЭПР, что подтверждается также данными об образовании этим белком громоздких олигомерных структур (рис. 1з).

Эксперименты in vivo. Получение модели перевиваемой гепатомы у мышей линии C57BL/6

Для создания модели развития гепатомы у мышей использовали линию опухолевых клеток печени мышей Нера 1-6 (производные гепатомы BW7756). При разработке модели был поставлен ряд предварительных опытов.

Определение оптимального количества вводимых клеток

Оптимальное количество вводимых мышам клеток выбирали с учетом опубликованных данных [18, 20]. Мышам-самцам (три группы по четыре особи в каждой) вводили подкожно в область холки по 2×10^4 , 2×10^5 , 4×10^6 клеток Нера 1-6 соответственно. Оказалось, что наибольший эффект достигался при введении 2×10^5 клеток: на 35-й день опухоли образовались у трех из четырех мышей этой группы и только у двух мышей, которым ввели 4×10^6 клеток. Ни у одной мыши, полу-

чившей 2×10^4 клеток, новообразований не обнаружили (табл. 2).

Образцы опухолей лизировали, с помощью иммуноблотинга оценили экспрессию АФП в лизатах, и выявили значительное накопление белка в клетках опухолей (рис. 5а). Активное образование АФП подтверждено иммуногистохимически на срезах опухолей (рис. 5б).

Самцы линии C57BL/6 более подвержены развитию опухоли после перевивки клеток Нера 1-6, чем самки

С целью определения возможных гендерных различий в развитии опухолей после перевивки клеток использовали 20 мышей: 10 самцов и 10 самок. Пяти самцам и пяти самкам вводили по 2×10^5 клеток Нера 1-6. Остальным животным вводили гомогенат опухоли (в количестве, соответствующем количеству перевитых клеток), полученной от другой мыши, которой ранее перевивали клетки Нера 1-6. На 35-й день после введения опухолевых клеток неоплазии образовались у одного из пяти самцов, которым ввели клетки Нера 1-6, а также у всех пяти самцов, которым перевивали гомогенат. Только у двух самок из пяти, которым перевивали гомогенат, обнаружена опухоль. Все самки, которым вводили клетки, были совершенно здоровыми.

Иммунизированные мыши вырабатывают антитела против АФП

Для определения влияния ДНК-вакцинации на выработку специфических антител 20 мышей дважды с интервалом в 2 нед иммунизировали ДНК-вакцинами, после чего забивали и методом ИФА определяли содержание антител против АФП в сыворотках. Антитела IgG1 и IgG2a, направленные против АФП, обнаружены только у животных из групп, иммунизированных векторами рАФР и рΔAFPODCsignal, причем в группе мышей, вакцинированных рАФР, средний титр антител IgG1 составлял 1 : 350, а титр антител IgG2a – 1 : 200, что может косвенно указывать на

Таблица 2. Результаты эксперимента по перевивке клеток Нера 1-6 мышам

Перевиваемые клетки Нера 1-6, количество	Мыши с опухолью*
2×10^4	0/4
2×10^5	3/4
4×10^6	2/4

* Образование опухоли фиксировали на 35-й день после перевивки.

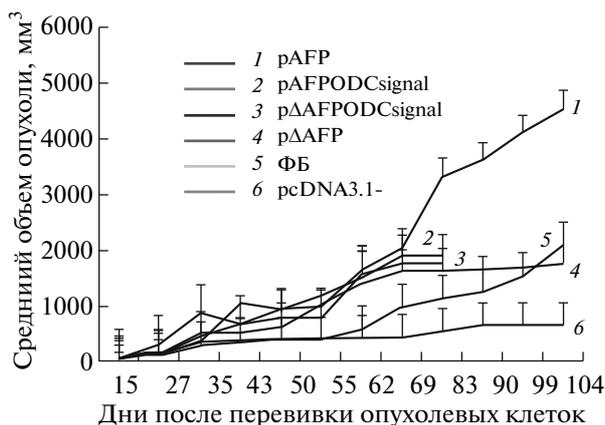


Рис. 6. Терапевтический эксперимент. На 15-й день после перевивки опухоли животных (шесть групп по восемь мышей) вакцинировали одним из векторов (100 мкг) или ФБ (100 мкл). Животных наблюдали в течение 90 дней и регулярно определяли объем опухоли. Стандартное отклонение обозначено.

стимуляцию Th2-иммунного ответа. Напротив, в группе мышей, иммунизированных pΔAFPODCsignal, титр антител IgG1 составлял 1 : 300, а антител IgG2a – примерно 1 : 250, т.е. уровень антител обоих типов был практически одинаковым, что указывает на некоторое усиление Th1-иммунного ответа и преодоление иммунологической толерантности.

ДНК-вакцинация не способствует регрессии или замедлению роста опухоли в терапевтическом эксперименте

Для определения эффекта ДНК-вакцинации на уже сформированную солидную опухоль выполнен терапевтический эксперимент, в котором использовали 48 самцов мышей (шесть групп по восемь животных) линии C57BL/6. Мышам предварительно перевивали 2×10^5 клеток опухолевой ткани, через 2 нед вводили двойную дозу (100 мкг) ДНК-вакцины. В результате не выявили какой-либо значительной регрессии опухолей в группах иммунизированных животных. Однако в группе мышей, иммунизированных контрольным вектором pcDNA3.1-, наблюдалось некоторое замедление развития новообразований (рис. 6).

Предварительная вакцинация мышей pΔAFPODCsignal способствует значительному замедлению роста опухоли у животных

Может ли ДНК-вакцина предотвратить или замедлить рост опухоли? Чтобы ответить на этот вопрос взяли 18 животных (три группы по шесть мышей в каждой), которых иммунизировали 50 мкг pcDNA3.1-, pΔAFPODCsignal или 50 мкл ФБ соответственно (4 раза с интервалом в

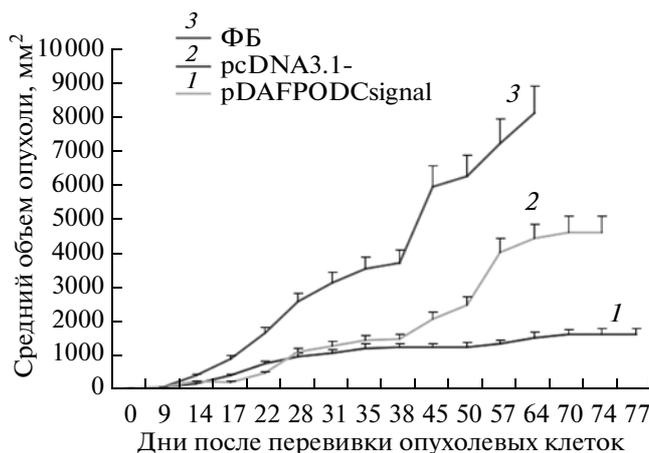


Рис. 7. Профилактический эксперимент. Динамика роста опухоли в группах животных, вакцинированных pΔAFPODCsignal, pcDNA3.1(-) или фосфатным буфером (ФБ). Обозначено стандартное отклонение.

2 нед). Спустя 2 нед после последней вакцинации мышам вводили по 2×10^5 клеток гомогенизированной опухолевой ткани. На 65-й день после перевивки опухолевых клеток у мышей, иммунизированных pΔAFPODCsignal, средний объем опухоли был на 300% меньше, чем у животных, иммунизированных pcDNA3.1-, и на 500% меньше, чем у мышей из контрольной группы (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ГЦК – это онкологическое заболевание, развитие которого потенциально можно предотвратить с помощью вакцинации. Ключом к созданию такой вакцины может стать АФП, который активно экспрессируется клетками гепатомы (в 80% случаев) и считается маркером этой опухоли [28].

В процессе канцерогенеза АФП выполняет целый ряд функций, необходимых для роста и развития опухоли. Одна из них – иммуносупрессорная [29, 30]. АФП влияет практически на все звенья иммунной системы: подавляет выработку антител и созревание цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ), не влияя на активность зрелых Т- и В-лимфоцитов [31]; подавляет пролиферативный ответ лимфоцитов на митогены [32]; снижает выработку клетками иммунной системы цитокинов, необходимых для развития иммунного ответа [33–35]; повышает активность специфических Т-супрессоров [36–38], а также снижает фагоцитирующую способность макрофагов и натуральных киллеров [39]. АФП, стимулируя экспрессию FAS-лигандов клетками опухоли, способствует вступлению опухолеинфильтрирующих лимфоцитов в апоптоз [40]. Таким образом, опухолевые клетки, экспрессирующие АФП, предохраняют

себя от контакта с угрожающими им клетками иммунной системы. Кроме того, АФП — это эффективный регулятор роста и пролиферации как нормальных, так и опухолевых клеток [41–44], способный как стимулировать, так и подавлять их рост. Установлена дозозависимая стимуляция роста клеток пяти опухолевых линий, инкубируемых в среде, содержащей менее 100 мкг/мл АФП, при больших концентрациях наблюдался обратный эффект [42]. Механизм такого рода регуляции связывают с конформационными изменениями третичной структуры АФП после взаимодействия с некоторыми лигандами — стероидными гормонами и жирными кислотами. В результате взаимодействия со стероидными гормонами экспонируется скрытый эпитоп, способный замедлять пролиферацию клеток. Связывание АФП с ненасыщенными жирными кислотами, такими как арахидоновая, приводит к превращению АФП в фактор роста, стимулирующий рост эндцитированных его клеток [41]. На некоторых линиях опухолевых клеток (Bel7402) показано, что АФП стимулирует рост клеток путем увеличения содержания сАМР и активации протеинкиназы А. При этом усиливается экспрессия онкогена *N-ras* и мутантных форм *p53* и *p21* [45]. При подавлении синтеза АФП в опухолевых клетках Huh7 с помощью малых интерферирующих РНК наблюдалось существенное замедление клеточного роста, а также вступление значительного числа клеток в апоптоз [44]. Подобный эффект связывают с подавлением экспрессии мутантного *p53*, что приводит к сдвигу соотношения проапоптотического фактора Вах и противоапоптотического фактора Bcl-2 в сторону Вах. После этого высвобождается цитохром С и активируется каспаза 3, что, в конечном итоге, приводит к апоптозу [44]. Более того, показано, что АФП может действовать совместно (проявлять синергизм) с некоторыми цитокинами (интерферон- α , фактор некроза опухолей), факторами роста (эпителиальный фактор роста, фактор роста тромбоцитов, инсулиноподобный фактор роста 1) и онкогенами (*c-fos*, *c-jun*, *N-ras*), стимулируя пролиферацию клеток рака молочной железы и рака прямой кишки [42, 46–48]. Однако получены также результаты, указывающие на проапоптотическое действие АФП [42]. АФП взаимодействует с ингибиторами апоптоза (белками сIAP-2 и XIAP) и препятствует их связыванию с каспазами 3 и 9, что приводит к активации каспаз и апоптозу [43, 49]. Таким образом, наблюдаются некоторые противоречия в результатах, полученных в разных группах. Важно отметить, что проапоптотическая функция АФП показана с использованием эмбрионального белка, а его противоапоптотический эффект и рост-стимулирующую функцию наблюдали у АФП, который продуцировали опу-

холевые клетки. Вероятно, эти эффекты связаны со структурными особенностями белков. Есть данные, что эмбриональный АФП и АФП, синтезируемый опухолевыми клетками, имеют разные конформационно-зависимые наборы экспонированных эпитопов, что может влиять на функцию белка в целом [50]. Кроме того, важную роль в росте и развитии ГЦК играют клетки стромы. Секретируемый фибробластами коллаген обеспечивает структурную основу, необходимую для поддержания роста ГЦК. На мембранах различных клеток стромы обнаружены рецепторы-мусорскии (SR-A1, SR-B1, LOX-P), способные связывать АФП [51]. Можно предположить, что паренхимные клетки опухоли, в том числе и посредством экспрессии АФП, осуществляют “диалог” с клетками стромы, играющий важную роль в канцерогенезе. Таким образом, АФП представляется своего рода краеугольным камнем для роста и пролиферации, а также защиты опухолевых клеток, поэтому иммунотерапия ГЦК на основе АФП считается перспективной [41].

Опыты по созданию эффективной противоопухолевой терапии на основе АФП показали возможность активации иммунного ответа на данный аутоантиген. Оказалось, что популяция лимфоцитов, распознающих эпитопы АФП, не элиминируется в эмбриогенезе, а продолжает циркулировать в крови взрослых особей на протяжении всей жизни [9, 10]. Эти лимфоциты отличались неактивным “пассивным” состоянием, однако удалось показать, что они могут активироваться антигенными эпитопами АФП [9, 10]. Более того, в структуре АФП выделены четыре иммунодоминантных района [9, 11], на основе эпитопов которых предложена пептидная терапия, подразумевающая введение больным пептидов с первичной структурой, соответствующей этим районам. Однако подобные подходы оказались недостаточно эффективными *in vivo* [14, 52]. В дальнейшем в структуре АФП выявили целый ряд так называемых субдоминантных районов. Иммунный ответ больных ГЦК на эпитопы некоторых из них не отличался, а порой превосходил ответ на эпитопы иммунодоминантных областей. Наконец, показаны различия в иммунном ответе на эпитопы АФП у разных больных, а также высказано предположение о том, что более сильный иммунный ответ на АФП возникает при иммунизации не пептидами, а полноразмерным белком [10]. Также установлена существенная роль представления эпитопов АФП иммунным клеткам комплексами ГКГ классов I и II, что непосредственно влияло на характер иммунного ответа [10]. При создании вакцины против опухоли приоритет чаще отдается получению клеточного иммунного ответа против онкомаркера, а вакцинация полноразмерным белком или его пептидами

как правило приводит к стимуляции гуморального иммунного ответа. Причина этого заключается в том, что АФП не синтезируется клетками организма, а попадает в него извне, циркулирует в крови и после захвата клетками иммунной системы разрушается в основном в лизосомах, а полученные пептиды представляются на мембранах клеток в комплексе с молекулами ГКГ класса II, вызывая преимущественную активацию Th2-иммунного ответа. Обеспечить активацию клеточного иммунного ответа против АФП можно, если создать условия для внутриклеточного синтеза белка и его деградации в протеасоме. Это позволит антигенпредставляющим клеткам более эффективно представлять пептиды АФП иммунным клеткам с помощью молекул ГКГ класса I и вызовет развитие клеточного иммунного ответа против клеток, продуцирующих АФП.

ДНК-вакцина представляет собой один из возможных путей решения этой проблемы. В разных странах в течение последних 10 лет пытались создать ДНК-вакцины, кодирующие АФП и его производные [15–21]. Получены результаты, подтверждали перспективность этого подхода, однако применяемые ДНК-вакцины не обеспечивали должной защиты. Кроме того, стратегии иммунизации предложенными векторами были достаточно сложными.

Нами предложен новый подход, в котором для активации иммунного ответа, направленного против АФП, используется ДНК-вакцина и обеспечивается быстрая протеасомная деградация рекомбинантного белка. Важно отметить, что уже разработаны и показали свою эффективность методы модификации рекомбинантных белков для направления их в протеасому путем слияния с последовательностями, приводящими к убиквитинированию. Так, в составе вектора последовательности, кодирующие два ассоциированных с меланомой антигена (иммуногенные пептиды из семи и восьми аминокислотных остатков соответственно) были слиты с геном, кодирующим убиквитин. Однако не исключено, что при использовании такой системы может развиваться иммунный ответ на убиквитин и, в свою очередь, аутоиммунные реакции на этот белок [53].

Уменьшить вероятность подобных эффектов и повысить эффективность вакцины мы попытались, используя дегрон ОДК в одной рамке считывания с АФП для направления рекомбинантного белка на деградацию в протеасому. ОДК – это короткоживущий регуляторный белок, ключевой компонент клеточной системы синтеза полиаминов [54]. Особенность ОДК заключается в ее быстрой и направленной деградации в протеасоме по убиквитин-независимому пути [55]. На С-конце молекулы ОДК находится дегрон – уча-

сток из 37 аминокислотных остатков [56, 57]. Известно, что введение дегрона, а также полноразмерной ОДК на С-конец различных белков приводит к их быстрой деградации в протеасоме [22, 25].

Нами созданы четыре экспрессионных вектора: рАФП – кодирующий АФП дикого типа; рАФ-PODCsignal – кодирующий АФП дикого типа с дегроном ОДК на С-конце; рΔАФП – кодирующий АФП дикого типа без N-концевого сигнала экспорта; рΔАФPODCsignal – кодирующий АФП с дегроном ОДК на С-конце и без N-концевого сигнала экспорта. Важно отметить, что конструкции рΔАФП и рΔАФPODCsignal кодировали белки без сигнала экспорта чтобы обеспечить накопление белков ΔАФП и ΔАФPODCsignal в цитоплазме трансфицированных клеток и облегчить их взаимодействие с цитоплазматическими протеасомами. Методами *in vitro* оценили уровень рекомбинантных белков, их секрецию из трансфицированных клеток, внутриклеточную локализацию, скорость протеасомной деградации, а также олигомеризацию. С помощью Вестерн-блоттинга показано, что рекомбинантные белки эффективно синтезируются в трансфицированных клетках, однако их накопление в лизатах клеток значительно различалось, несмотря на соизмеримое количество общего белка, нанесенного на ПААГ. Количество ΔАФП, ΔАФPODCsignal в лизатах трансфицированных клеток было значительно меньше, чем других рекомбинантных белков. Объяснение этому феномену частично содержится в работе [24], в которой показана роль сигнала экспорта в регуляции экспрессии генов. Установлено, что в присутствии этого сигнала усиливается экспрессия вирусных белков [24]. Эти результаты получены на модели, использующей белок Eпv ретровируса Jaagsiekte, однако, можно предположить, что сходные механизмы регуляции экспрессии работают и в других случаях, где присутствуют подобные сигналы. С другой стороны, малое количество ΔАФPODCsignal в лизатах трансфицированных клеток можно объяснить присутствием на С-конце белка дегрона ОДК, который теоретически обеспечивает направленную протеасомную деградацию белка. Неожиданно большое количество АФPODCsignal в лизатах трансфицированных клеток нуждается в дополнительном объяснении. Более того, показано, что только АФП дикого типа эффективно выбрасывается из клеток. Отсутствие секреции ΔАФП и ΔАФPODCsignal объясняется делецией сигнала экспорта АФП, однако АФPODCsignal не содержит такой модификации. Кроме того, с помощью ингибирования трансляции циклогексимидом определено время жизни химерных белков в клетках. Наименее стабильным оказался ΔАФPODCsignal с периодом полураспада 2 ч, другие же белки были одинаково стабильными в течение 6–8 ч

и более. Интересно, что количество АФР дикого типа практически не менялось со временем, несмотря на секрецию этого белка из трансфицированных клеток в нормальных условиях. Этот эффект связан, вероятно, с действием циклогексимида, а именно, с ингибированием трансляции белков, вовлеченных в процессы гликозилирования и непосредственно секреции. Таким образом, блокируется экспорт белка из клетки, при том, что циклогексимид не влияет существенно на активность протеасом. С помощью ингибирования протеасом показано, что быстрой и направленной протеасомной деградации подвергается только Δ AFPODCsignal, при этом AFPODCsignal в протеасоме не разрушается. Учитывая, что AFPODCsignal не секретируется из трансфицированных клеток (несмотря на наличие сигнала экспорта) и не деградирует в протеасоме, хотя несет дегрон ОДК, мы предположили, что AFPODCsignal накапливается в областях клетки, где он не имеет доступа к протеасомам. Для подтверждения этой гипотезы иммунофлуоресцентными методами анализировали локализацию рекомбинантных белков в трансфицированных клетках и выявили различия в их локализации. АФР дикого типа обнаруживался в основном в области клеточной мембраны, что может рассматриваться как промежуточный этап в пути его секреции. Как и ожидалось, Δ АФР, не содержащий N-концевой сигнал экспорта, локализовался в цитоплазме. Δ AFPODCsignal был плохо различим в трансфицированных клетках, что соответствовало данным о его протеасомной деградации. В отличие от других белков, rAFPODCsignal образовывал специфические агрегаты в виде серповидных структур, стабильных на протяжении нескольких часов. Возможную связь этих белковых агрегатов с какой-то определенной клеточной органеллой анализировали с использованием метода двойной иммунофлуоресценции с антителами как против АФП, так и против кальнексина, внутреннего белка ЭПР. Колокализация упомянутых белковых агрегатов AFPODCsignal и кальнексина, подтверждает предположение о том, что серповидные структуры AFPODCsignal формируются в ЭПР. По-видимому, рекомбинантный белок “застревает” в ЭПР, поэтому он защищен от протеасомной деградации. Данный феномен можно объяснить наличием сигнала экспорта на 5'-конце мРНК, который после начала трансляции распознается сигнал-распознающей частицей (SRP), после чего трансляция продолжается на рибосомах шероховатого ЭПР. Синтезированный таким образом белок оказывается внутри ЭПР, где не контактирует с цитоплазматическими протеасомами, что и объясняет отсутствие его деградации. Несмотря на наличие сигнала экспорта, AFPODCsignal, в отличие от АФП дикого типа, не

секретируется, что, на наш взгляд, связано с присутствием дегрона ОДК. Хотя в данном случае дегрон не выполняет свою основную функцию — направление белка в протеасому — он каким-то образом препятствует секреции химерного белка и способствует его накоплению в ЭПР. Механизм этого остается неясным, так как дегрон ОДК не содержит мотивов KDEL или KKXX и практически не имеет положительно заряженных аминокислотных остатков, которые могли бы обеспечить локализацию химерного белка в ЭПР. Возможно, в состав дегрона ОДК входят неизвестные последовательности, выполняющие роль мотивов, препятствующих экспорту химерного белка из ЭПР, или же здесь играет роль сильная олигомеризация AFPODCsignal. Известно, что АФП способен агрегировать и образовывать димеры, тримеры, а также различные олигомеры [26, 27]. В нашей работе также показано, что димеры, тримеры и даже тетрамеры образуют все рекомбинантные белки, однако, наиболее выраженные олигомерные структуры выявлены в лизате клеток, трансфицированных вектором rAFPODCsignal. Можно предположить, что образование таких крупных белковых агрегатов и есть основная причина, которая сильно затрудняет процессы экспорта AFPODCsignal из клетки.

Согласно полученным результатам, наиболее перспективным в качестве вакцины оказался вектор r Δ AFPODCsignal. В первую очередь, это связано с тем, что кодируемый им рекомбинантный белок быстро и направленно деградировал в протеасоме, поэтому в экспериментах *in vivo* именно этому вектору уделялось наибольшее внимание.

Сначала на мышах линии C57BL/6 была создана модель развития гепатомы, причем рост опухоли вызывали перевивкой клеток Нера 1-6. Определенная нами оптимальная концентрация клеток, вводимых животным ($\sim 2 \times 10^5$ клеток), в целом согласуется с результатами других лабораторий (от 2×10^4 до 4×10^6 клеток) [17, 20]. Кроме того, обнаружены пол-зависимые различия в эффективности приживаемости опухолевых клеток. Самцы оказались намного менее резистентными, чем самки, что можно объяснить присутствием эстрогенов в крови самок. Известно, что АФП связывает эстрогены [58–60], при этом сам АФП, секретируемый клетками ГЦК, обладает выраженным иммуносупрессорным действием [29, 30]. Таким образом, мы полагаем, что в организме самок после перевивки опухолевых клеток и начала активного синтеза АФП эстрогены связывались с АФП, тем самым снижалась концентрация свободного АФП в сыворотке и ослаблялось его иммуносупрессорное действие, что препятствовало ослаблению иммунного ответа животных. Отсутствие же большого количества эстрогенов в крови

самцов приводило к полноценной супрессии иммунного ответа секретированным АФП, который создавал благоприятные условия для роста опухоли. Учитывая все это, в дальнейших экспериментах мы использовали только самцов.

Развитие иммунного ответа подтверждено повышением титра антител против рекомбинантного АФП после иммунизации плазмидами рΔAFPODCsignal и рAFP. Важно отметить, что в группе мышей, вакцинированных рAFP, наблюдалось увеличение титра IgG1 по сравнению с титром антител IgG2a. Это может косвенно указывать на стимуляцию Th2-иммунного ответа. Напротив, в группе мышей, иммунизированных рΔAFPODCsignal, уровень антител обоих типов был практически одинаковым, что указывает на более сбалансированный иммунный ответ и даже на некоторое усиление Th1-иммунного ответа. Уменьшение соотношения IgG1/IgG2a говорит об увеличении концентрации цитокинов, вырабатываемых клетками Th1. В результате синтеза ко-стимуляторных молекул изменяется класс антител, продуцируемых В-лимфоцитами: Th1-клетки стимулируют выработку IgG2a, в то время как цитокины хелперных Th2-лимфоцитов способствуют увеличению концентрации IgG1. В свою очередь, Th1-клетки дополнительно стимулируют Т-лимфоциты CD8+, направленные против АФП. Таким образом, изменение соотношения IgG1/IgG2a может служить косвенным признаком стимуляции специфических ЦТЛ, распознающих эпитопы АФП. С целью более глубокой оценки иммуностимулирующего эффекта и противоопухолевого действия ДНК-вакцин были проведены терапевтический и профилактический эксперименты. Могут ли ДНК-вакцины замедлить рост ГЦК? Чтобы ответить на этот вопрос животным сначала перевивали опухолевую ткань. Через 15 дней мышей разделили на шесть групп (две контрольные). Этим животным вводили ФБ или рсDNA3.1(-). Мышей из оставшихся четырех групп однократно вакцинировали одним из экспрессионных векторов. Затем на протяжении 90 дней анализировали динамику увеличения объема опухоли. В терапевтическом эксперименте не выявили существенного замедления роста опухоли у иммунизированных животных, напротив, наблюдалось некоторое ускорение ее роста. Такие результаты можно, с одной стороны, объяснить недостаточной стимуляцией иммунного ответа рекомбинантными белками при наличии в организме животного опухоли, а с другой, иммуносупрессорным действием АФП, так как подавление иммунного ответа, вызванное АФП, синтезированным клетками опухоли, может дополнительно усиливаться в присутствии рекомбинантного АФП. Более того, рекомбинантный АФП как регулятор роста и пролиферации может способство-

вать росту ГЦК [42, 61], особенно ярко этот эффект выражен при вакцинации мышей рAFP. Важно отметить, что замедление роста опухолей у животных, иммунизированных рсDNA3.1(-), может быть связано с отсутствием АФП-ассоциированной иммуносупрессии, с одной стороны, и неспецифической активацией иммунного ответа неметилованными CpG-динуклеотидными последовательностями вектора, с другой [62, 63]. Результаты опытов *in vitro* и терапевтического эксперимента, а также опубликованные данные указывают на отсутствие выраженного эффекта рAFP при профилактическом использовании [17, 19], поэтому мы уменьшили количество конструкций, тестируемых на животных, а в качестве наиболее перспективного вектора выбрали рΔAFPODCsignal.

Профилактический эксперимент был выполнен, чтобы определить, можно ли предотвратить развитие ГЦК у мышей при помощи вакцинации вектором рΔAFPODCsignal. Животных вакцинировали 4 раза с интервалом 14 дней рΔAFPODCsignal, рсDNA3.1(-) или ФБ, после чего им перевивали клетки опухоли. Показано пятикратное замедление роста опухоли в группе мышей, иммунизированных рΔAFPODCsignal, по сравнению с контрольной группой. Это свидетельствует в пользу того, что направленная протеасомная деградация ΔAFPODCsignal (за счет С-концевого дегрона ОДК) позволяет преодолеть толерантность и стимулирует противоопухолевый иммунный ответ. Использование полноразмерного АФП очень важно для развития иммунного ответа к различным эпитопам [10]. При этом образуются клетки памяти, которые обеспечивают дальнейшую защиту животных и эффективное отторжение перевитой им опухолевой ткани. Подобная иммунизация существенно замедляет рост новообразований, однако, не приводит к полной защите вакцинированных мышей от развития опухоли. Объяснение этого феномена может быть связано с тем, что в опухоли есть клетки, практически не экспрессирующие АФП. В результате иммунного ответа такие клетки не элиминируются специфически и потенциально могут обеспечить выживание опухоли [64, 65]. Учитывая результаты обоих экспериментов (профилактического и терапевтического), а также все полученные нами данные, можно сделать предварительный вывод о том, что направление рекомбинантного АФП, слитого с дегроном ОДК (ΔAFPODCsignal), в протеасому обеспечивает необходимые условия для стимуляции ЦТЛ, направленных против АФП-продуцирующих клеток. Благодаря этому у вакцинированных животных вырабатывается противоопухолевый иммунный ответ, обеспечивающий существенное замедление роста ГЦК. Следует отметить перспективность такого

подхода при создании профилактических вакцин не только против онкологических, но и инфекционных заболеваний, при которых протеасомной деградации будут подвергаться белки-мишени и будет стимулироваться специфический иммунный ответ. В целом, результаты нашей работы свидетельствуют в пользу выбранного направления и принципиальной возможности создания эффективной ДНК-вакцины против ГЦК на основе АФП человека.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Государственный контракт №16.512.11.2068 от 16 февраля 2011 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Практические рекомендации Всемирной Гастроэнтерологической Организации, Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК): глобальная перспектива 2009.
2. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease (7th ed.). 2004. Eds Kumar V., Fausto N., Abbas A. Philadelphia, PA: Saunders, 914–917.
3. Татарин Ю.С. 1964. Обнаружение эмбриоспецифического α -глобулина в сыворотке крови больного первичным раком печени. *Вопр. мед. химии*. **1**, 90–91.
4. Abelev G.I., Assecritova I.V., Kraevsky N.A., et al. 1967. Embryonal serum α -globulin in cancer patients, diagnostic value. *Int. J. Cancer*. **2**, 551–558.
5. Abelev G.I. 1971. Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv. Cancer Res.* **14**, 295–358.
6. Abelev G.I. 1974. α -Fetoprotein as a marker of embryo-specific differentiations in normal and tumor tissues. *Transplant. Rev.* **20**, 3–37.
7. Ruoslahti E., Seppala M. 1979. Alpha-fetoprotein in cancer and fetal development. *Adv. Cancer Res.* **29**, 276–346.
8. Blair J.I., Carachi R., Gupta R., et al. 1987. Plasma alpha fetoprotein reference ranges in infancy: effect of prematurity. *Arch. Dis. Child.* **62**(4), 362–369.
9. Butterfield L.H., Koh A., Meng W., et al. 1999. Generation of human T-cell responses to an HLA-A2.1-restricted peptide epitope derived from alpha-fetoprotein. *Cancer Res.* **59**, 3134–3142.
10. Thimme R., Neagu M., Boettler T., et al. 2008. Comprehensive analysis of the alpha-fetoprotein-specific CD8+ T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. **48**, 1821–1833.
11. Butterfield L.H., Meng W.S., Koh A., et al. 2001. T cell responses to HLA-A*0201-restricted peptides derived from human alpha-fetoprotein. *J. Immunol.* **166**, 5300–5308.
12. Butterfield L.H., Ribas A., Meng W.S., et al. 2003. T-cell responses to HLA-A*0201 immunodominant peptides derived from alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular cancer. *Clin. Cancer Res.* **9**(16 Pt 1), 5902–5908.
13. Butterfield L.H., Ribas A., Disette V.B., et al. 2006. A phase I/II trial testing immunization of hepatocellular carcinoma patients with dendritic cells pulsed with four alpha-fetoprotein peptides. *Clin. Cancer Res.* **12**(9), 2817–2825.
14. Bei R., Mizejewski G.J. 2011. Alpha-fetoprotein is more than hepatocellular cancer biomarker: from spontaneous immune response in cancer patients to the development of an AFP-based cancer vaccine. *Curr. Mol. Med.* **11**(7), 564–581.
15. Grimm C.F., Ortmann D., Mohr L., et al. 2000. Mouse alpha-fetoprotein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice. *Gastroenterology*. **119**(4), 1104–1112.
16. Hanke P., Serwe M., Dombrowski F., et al. 2002. DNA vaccination with AFP-encoding plasmid DNA prevents growth of subcutaneous AFP-expressing tumors and does not interfere with liver regeneration in mice. *Cancer Gene Ther.* **9**(4), 346–355.
17. Saeki A., Nakao K., Nagayama Y., et al. 2004. Diverse efficacy of vaccination therapy using the α -fetoprotein gene against mouse hepatocellular carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* **13**, 111–116.
18. Tian G., Yi J., Xiong P. 2004. Specific cellular immunity and antitumor responses in C57BL/6 mice induced by DNA vaccine encoding murine AFP. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* **3**(3), 440–443.
19. Wang X.P., Liu G., Song A., et al. 2004. Antitumor immunity induced by DNA vaccine encoding alpha-fetoprotein/heat shock protein 70. *W. J. Gastroenterol.* **10**(21), 3197–3200.
20. Lan Y., Li Y., Liang Z., et al. 2007. A DNA vaccine against chimeric AFP enhanced by HSP70 suppresses growth of hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **56**, 1009–1016.
21. Rodríguez M.M., Ryu S.M., Qian C., et al. 2008. Immunotherapy of murine hepatocellular carcinoma by alpha-fetoprotein DNA vaccination combined with adenovirus-mediated chemokine and cytokine expression. *Hum. Gene Ther.* **19**(7), 753–759.
22. Starodubova E.S., Boberg A., Litvina M., et al. 2008. HIV-1 reverse transcriptase artificially targeted for proteasomal degradation induces mixed Th1/Th2-type immune response. *Vaccine*. **26**, 5170–5176.
23. Морозов А.В., Тимофеев А.В., Морозов В.А., Карпов В.Л. 2011. Наличие и каноническое положение ключевых аминокислот дедрона орнитиндекарбоксилазы – недостаточное условие для деградации альфа-фетопротеина. *Молекуляр. биология*. **45**(3), 529–537.
24. Caporale M., Arnaud F., Mura M., et al. 2009. The signal peptide of a simple retrovirus envelope functions as a posttranscriptional regulator of viral gene expression. *J. Virol.* **83**(9), 4591–4604.
25. Jungbluth M., Renicke C., Taxis C. 2010. Targeted protein depletion in *Saccharomyces cerevisiae* by activation of a bidirectional degron. *BMC Syst. Biol.* **4**, 176.

26. Wu J.T., Waterhouse W.J. 1982. Identification of alpha-fetoprotein polymers. Artifacts of the isolation procedure. *Clin. Chim. Acta.* **125**(1), 9–19.
27. Wu J.T., Knight J.A. 1985. *In vitro* stability of human alpha-fetoprotein. *Clin. Chem.* **31**(10), 1692–1697.
28. Абелев Г.И. 1994. Альфа-фетопротеин: Биология, биохимия, молекулярная генетика. *Иммунология.* **3**, 4–9.
29. Murgita R.A., Tomasi T.B. 1975. Suppression of the immune response by α -fetoprotein. *J. Exp. Med.* **141**, 269–286.
30. Semeniuk D.J., Boismenu R., Tam J., et al. 1995. Evidence that immunosuppression is an intrinsic property of the alpha-fetoprotein molecule. *Adv. Exp. Med. Biol.* **383**, 25–269.
31. Peck A.B., Murgita R.A., Wigze U.H. 1978. Cellular and genetic restrictions in the immunoregulatory activity of AFP. II. AFP-induced suppression of cytotoxic T-lymphocyte development. *J. Exp. Med.* **148**(2), 360–372.
32. Czokalo M., Wisniewski L. 1981. Culture conditions modify the effects exerted by human fetal AFP on some lymphocyte functions *in vitro*. *Exp. Pathol.* **20**(4), 233–238.
33. Aussel C., Masseyeff R. 1976. Alpha-fetoprotein and oestrogen metabolism. I. Influence of alpha-fetoprotein on the metabolism of steroids by rat liver microsomes *in vitro*. *Biochimie.* **58**(6), 737–741.
34. Aussel C., Fehlmann M. 1987. Effect of alpha-fetoprotein and indomethacin on arachidonic acid metabolism in P388D1 macrophages: role of leukotrienes. *Prostaglandins Leukot. Med.* **28**(3), 325–336.
35. Wang W., Alpert E. 1995. Downregulation of forbol 12-myristate 13-acetate-induced TNF- α and IL-1- β production and gene expression in human monocytic cells by human alpha-fetoprotein. *Hepatology.* **22**(3), 921–928.
36. Toder V., Blank M., Nebel L. 1982. Immunoregulatory mechanisms in pregnancy. Evidence for the alpha-fetoprotein-induced generation of suppressor cells *in vitro*. *Transplantation.* **33**(1), 9741–9744.
37. Murgita R.A., Goidl E.A., Kontianen S., Wigze U.H. 1977. Alpha-fetoprotein induces suppressor T cells *in vitro*. *Nature.* **267**(5608), 257–259.
38. Belyaev N.N., Bogdanov A.Yu., Savvulidi P.G., et al. 2008. The influence of Alpha-fetoprotein on natural suppressor cell activity and Ehrlich carcinoma growth. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **12**, 193–197.
39. Olinescu J., Laky M., Pofescu D., et al. 1977. The effect of alpha-fetoprotein on the immune response. III. Diminution of the phagocytic capacity of macrophages cultures *in vitro* in the presence of mouse amniotic fluid or alpha-fetoprotein. *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol.* **36**(3–4), 247–253.
40. Li M.S., Ma Q.L., Chen Q., et al. 2005. Alpha-fetoprotein triggers hepatoma cells escaping from immune surveillance through altering the expression of Fas/FasL and tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand and its receptor of lymphocytes and liver cancer cells. *W. J. Gastroenterol.* **11**(17), 2564–2569.
41. Mizejewski G.J. 2002. Biological role of alpha-fetoprotein in cancer: prospects for anticancer therapy. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* **2**, 89–115.
42. Dudich E., Semenhova L., Gorbatova E., et al. 1998. Growth-regulative activity of human alpha-fetoprotein for different types of tumor and normal cells. *Tumor Biol.* **19**(1), 30–40.
43. Semenhova L., Dudich E., Dudich I., et al. 2003. Alpha-fetoprotein positively regulates cytochrome c-mediated caspase activation and apoptosome complex formation. *Eur. J. Biochem.* **270**, 4388–4399.
44. Yang X., Zhang Y., Zhang L., et al. 2008. Silencing alpha-fetoprotein expression induces growth arrest and apoptosis in human hepatocellular cancer cell. *Cancer Lett.* **271**, 281–293.
45. Li M.S., Li P.F., He S.P., et al. 2002. The promoting molecular mechanism of alpha-fetoprotein on the growth of human hepatoma Bel7402 cell line. *W. J. Gastroenterol.* **8**(3), 469–475.
46. Leal J.A., Gangrade B.K., Kiser J.L., et al. 1991. Human mammary tumor cell proliferation: primary role of platelet-derived growth factor and possible synergism with human alpha-fetoprotein. *Steroids.* **56**, 247–251.
47. Keel B.A., Eddy K.B., Cho S. 1991. Synergistic action of purified alpha-fetoprotein and growth factors on the proliferation of porcine granulosa cells in monolayer culture. *Endocrinology.* **129**, 217–225.
48. Yano H., Basaki Y., Oie S. 2007. Effects of IFN- α on alpha-fetoprotein expressions in hepatocellular carcinoma cells. *J. Interferon Cytokine Res.* **27**, 231–238.
49. Dudich E., Semenkova L., Dudich I., et al. 2006. Alpha-fetoprotein antagonizes X-linked inhibitor of apoptosis protein anticaspase activity and disrupts XIAP-caspase interaction. *FEBS J.* **273**(16), 3837–3849.
50. Yazova A.K., Goussev A.I., Christiansen M., et al. 2003. Human fetal and tumor alpha-fetoproteins differ in conformationally dependent epitope variants expression. *Immunol. Lett.* **85**(3), 261–270.
51. Mizejewski G.J. 2011. Review of the putative cell-surface receptors for alpha-fetoprotein: identification of a candidate receptor protein family. *Tumor Biol.* **32**, 241–258.
52. Liu Y., Daley S., Evdokimova V.N., et al. 2006. Hierarchy of α -fetoprotein (AFP)-specific T cell responses in subjects with AFP-positive hepatocellular cancer. *J. Immunol.* **177**, 712–721.
53. Xiang R., Lode H.N., Chao T.H., et al. 2000. An autologous oral DNA vaccine protects against murine melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 5492–5497.
54. Tabor C.W., Tabor H. 1984. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 749–790.
55. Murakami Y., Matsufuji S., Kameji T., et al. 1992. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature.* **360**(6404), 597–599.
56. Ghoda L., van Daalen Wetters T., Macrae M., et al. 1989. Prevention of rapid intracellular degradation of ODC by a carboxyl-terminal truncation. *Science.* **243**(4897), 1493–1495.

57. Takeuchi J., Chen H., Hoyt M.A., Coffino P. 2008. Structural elements of the ubiquitin-independent proteasome degron of ornithine decarboxylase. *Biochem. J.* **410**(2), 401–407.
58. Gabant P., Forrester L., Nichols J., Van Reeth T., et al. 2002. Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**(20), 12865–12870.
59. De Mees C., Laes J.F., Bakker J., et al. 2006. Alpha-fetoprotein controls female fertility and prenatal development of the gonadotropin-releasing hormone pathway through an antiestrogenic action. *Mol. Cell. Biol.* **26**(5), 2012–2018.
60. Bakker J., De Mees C., Douhard Q., et al. 2006. Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nat. Neurosci.* **9**(2), 220–226.
61. Mizejewski G.J. 2001. Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes and conformational variants. *Exp. Biol. Med.* **226**(5), 377–408.
62. Klinman D.M., Yi A.K., Beaucage S.L., et al. 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 2879–2883.
63. Davila E., Velez M.G., Heppelmann C.J., Celis E. 2002. Creating space: an antigen-independent, CpG-induced peripheral expansion of naive and memory T lymphocytes in a full T-cell compartment. *Blood.* **100**, 2537–2545.
64. Abelev G.I., Eraiser T.L. 1999. Cellular aspects of alpha-fetoprotein reexpression in tumors. *Semin. Cancer Biol.* **9**(2), 95–107.
65. Cany J., Barteau B., Tran L., et al. 2011. AFP-specific immunotherapy impairs growth of autochthonous hepatocellular carcinoma in mice. *J. Hepatol.* **54**(1), 115–121.