

УДК 577.2.616-006;577.2.08

## КИШЕЧНЫЙ $\alpha$ -ДЕФЕНЗИН 5 СЕКРЕТИРУЕТСЯ В КРОВОТОК ОПУХОЛЯМИ ТОЛСТОЙ КИШКИ

© 2013 г. И. Г. Никитина<sup>1\*</sup>, Ю. А. Букурова<sup>1</sup>, С. Л. Ханкин<sup>2</sup>, В. Л. Карпов<sup>1</sup>,  
Н. А. Лисицын<sup>1</sup>, С. Ф. Берестень<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

<sup>2</sup>Медицинский центр Банка России, Москва, 117593

Поступила в редакцию 20.02.2012 г.

Принята к печати 19.04.2012 г.

Проведен поиск кишечного  $\alpha$ -дефензина в образцах сыворотки крови онкобольных и здоровых доноров. Кишечный  $\alpha$ -дефензин 5 не обнаружен во всех пяти образцах сыворотки здоровых доноров, тогда как в двух из пяти образцов сыворотки онкобольных выявлена процессированная форма этого белка. Полученные результаты позволяют предполагать возможность проведения сывороточной диагностики опухолей толстой кишки в группах повышенного риска.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -дефензин 5, опухолевые маркеры, клетки Панета, высокоаффинные антитела, сывороточная диагностика, опухоли толстой кишки.

ENTERIC ALPHA DEFENSIN 5 IS SECRETED INTO THE BLOOD STREAM BY COLON TUMORS, by I. G. Nikitina\*, Yu. A. Bukurova, V. L. Karpov, N. A. Lisitsyn, S. F. Beresten (Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; \*e-mail: nikitinainna87@yandex.ru; <sup>2</sup>Medical Center of the Bank of Russia, Moscow, 117593, Russia). It was demonstrated that enteric  $\alpha$ -defensin 5 is undetectable in five blood serum samples of healthy donors, whereas its processed form is present in two out of five serum samples of colon cancer patients. Obtained results open a possibility of serological diagnosis of colon tumors in high risk cancer patients.

**Keywords:**  $\alpha$ -defensin 5, tumor markers, Paneth cells, high affinity antibodies, serological diagnosis, colon tumors.

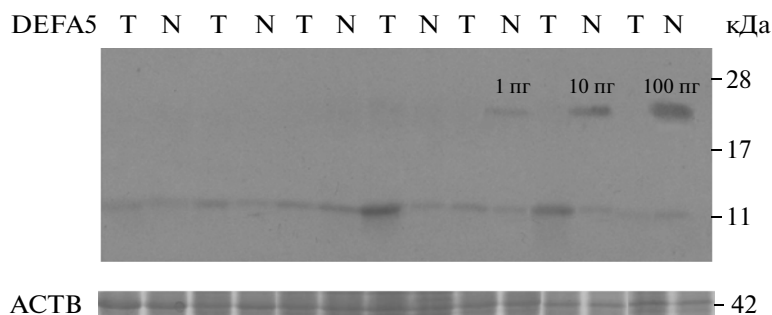
DOI: 10.7868/S0026898413010096

Количественное определение биологических маркеров в сыворотке крови и биологических жидкостях лиц из групп повышенного риска открывает возможность молекулярной диагностики ряда социально значимых заболеваний [1]. Биологические маркеры часто отбирают при помощи биоинформатических методов, большинство из которых основано на мета-анализе баз данных, аккумулирующих результаты детального сравнения транскриптомов и протеомов нормальных и пораженных заболеванием тканей. Недавно нами был разработан новый алгоритм биоинформатического поиска потенциальных сывороточных опухолевых маркеров [2], использование которого привело к идентификации потенциального маркера опухолей толстой кишки – кишечного  $\alpha$ -дефензина 5 (DEFA5) – небольшого белка, синтезируемого исключительно в клетках Панета.

Клетки Панета, относящиеся к системе врожденного иммунитета, располагаются в основании

крипт тонкого и толстого кишечника. Они защищают кишечный эпителий от инфекций и участвуют в регуляции состава кишечной микрофлоры [3]. На начальных этапах возникновения опухолей толстой кишки мутации в стволовых клетках, расположенных в основании крипт, приводят к конститутивной активации сигнального пути Wnt и преимущественной дифференцировке образующихся из них клеток в клетки Панета [4]. Сигнальный путь Wnt является ключевым регулятором экспрессии генов, кодирующих кишечные  $\alpha$ -дефензины, поэтому в большинстве аденом и части аденокарцином толстой кишки существенно (в 10 и более раз) повышен уровень этих белков [5]. Кроме того, заметно возрастает секреция кишечных дефензинов в кровотоки, тогда как здоровые клетки Панета секретируют антимикробные агенты преимущественно в просвет кишки и подстилающую соединительную ткань. В представленной работе проведена оценка возможности использования количественного им-

\* Эл. почта: nikitinainna87@yandex.ru



**Рис. 1.** Вестерн-блот-анализ содержания препробелка DEFA5 в суммарных белковых экстрактах опухолей толстой кишки (Т) и образцов нормального (N) эпителия (в последние три дорожки, содержащие экстракты нормальных тканей, добавлен гибридный белок DEFA5-TRX, количество указано).

муноанализа  $\alpha$ -дефензина 5 для сывороточной диагностики опухолей толстой кишки.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

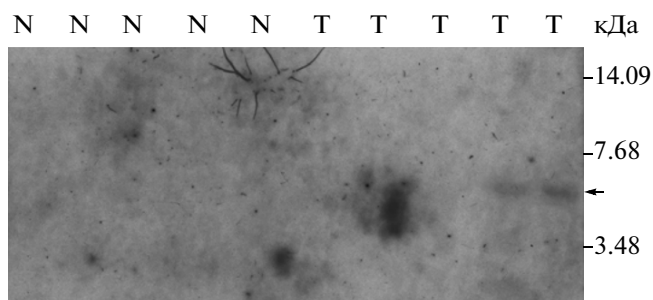
**Получение антител к дефензину 5.** Фрагменты ДНК, кодирующие препродефензин 5 и главную (мажорную) форму зрелого дефензина 5 человека (аминокислотные остатки 1–94 и 60–94 соответственно), синтезировали химически и клонировали в векторе pGEM<sup>®</sup>-T Easy. Правильные нуклеотидные последовательности отбирали секвенированием и субклонировали полученные фрагменты в экспрессионные векторы pET29b и pET32b соответственно. Препродефензин 5 и гибридный белок DEFA5-TRX, содержащий зрелый дефензин 5 и тиоредоксин, продуцировали в клетках *Escherichia coli* штамма BL21 (DE3) и очищали из бактериального лизата по стандартным протоколам. Кроличью антисыворотку к препродефензину 5 наносили на аффинный носитель (иммобилизованный на BtCN-сефарозе гибридный белок, использованный для иммунизации животных), очищали высокоаффинные поликлональные антитела к зрелому дефензину 5 по разработанной нами технологии.

**Вестерн-блот-анализ.** Пять парных образцов первичных опухолей толстой кишки ( $T_3N_0M_0$ ,  $T_3N_1M_0$ ,  $T_4N_2M_0$ ,  $T_4N_3M_0$  и  $T_4N_1M_1$ ) и нормальной слизистой, полученных в Медицинском центре Банка России, использовали для получения суммарных белковых экстрактов как описано ранее [6]. Белковые экстракты (20 мкг в 12.5 мкл) подвергали электрофорезу в градиентном полиакриламидном геле (10–20%) по методу Лэммли [7]. После разделения белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану, инкубировали с антителами к дефензину 5 (в концентрации 2 мкг/мл), и выявляли комплексы антиген-антитело конъюгатами вторых антител как описано ранее [2].

**Иммунопреципитация дефензина 5 из образцов сыворотки крови.** Антитела к дефензину 5 в фосфатно-солевом буфере (PBS) иммобилизовали на белок А-агарозе (“ИМТЕК”, Россия), несвязавшиеся антитела отмывали тем же буфером. Десять образцов сыворотки крови (объемом 4 мл), полученных в НИИ Онкологии СО РАН от пяти больных с диагнозом рак толстой кишки (стадии развития опухоли T3 и T4) и пяти здоровых доноров, инкубировали с 20 мкл аффинного носителя. Носитель промывали PBS и элюировали связавшиеся с антителами белки буфером для образцов Лэммли без дитиотреитола (60 мМ Трис-НСl, pH 6.8, 25% глицерина, 2% додецилсульфата натрия, 0.01% бромфенолового синего). Элюаты разделяли электрофорезом в 16.5%-ном полиакриламидном геле в Трис-трициновой буферной системе [8]. Дефензин 5 в дорожках геля выявляли при помощи Вестерн-блот-анализа как описано выше.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что кишечный  $\alpha$ -дефензин 5 человека содержится в секреторных гранулах клеток Панета в виде препробелка из 94 аминокислотных остатков (мол. масса 11 кДа). В процессе секреции препродефензин расщепляется трипсином с образованием зрелого глывного (остатки 63–94) и минорного (остатки 56–94) полипептидов [9–11]. Кишечный  $\alpha$ -дефензин 5 в образцах сыворотки крови выявляли с использованием полученных нами высокоаффинных поликлональных антител к главной форме зрелого белка по разработанной нами технологии. Константа сродства полученных антител, определенная согласно [12], оказалась весьма высокой ( $10^9$  л/моль), как и их специфичность, поскольку Вестерн-блот-анализ выявлял в суммарных белковых экстрактах нормальной и опухолевой тканей только одну полосу ожидаемого размера, соответствующую препробелку DEFA5 (рис. 1). Содержание препробелка варьировало от 1 до 10 пг на 20 мкг суммар-



**Рис. 2.** Вестерн-блот-анализ содержания расщепленного протеазами крови пробелка DEFA5 в иммунопреципитатах образцов сыворотки здоровых доноров (N) и больных раком толстой кишки (T).

ного белкового экстракта (0.05–0.5 миллионных долей).

Высокоаффинные антитела к DEFA5 использовали для получения иммунопреципитатов образцов сыворотки крови здоровых доноров и больных с диагнозом рак толстой кишки. Согласно результатам Вестерн-блот-анализа иммунопреципитатов, сыворотки здоровых доноров не содержат  $\alpha$ -дефензина 5, тогда как процессированная форма зрелого белка обнаружена в двух из пяти образцов сыворотки, полученной от онкобольных (рис. 2). При этом молекулярная масса обнаруженного в сыворотке белка (около 5 кДа) заметно отличается от массы главной формы зрелого  $\alpha$ -дефензина 5, секретируемого клетками Панета (3.6 кДа). Это, по-видимому, связано с тем, что опухолевые клетки секретируют в кровоток непротессированный пробелок, который впоследствии расщепляется протеазами крови. Полученные результаты позволяют говорить о возможности использования  $\alpha$ -дефензина 5 в серологической диагностике опухолей толстой кишки.

Многочисленные исследования привели к идентификации лишь трех белковых маркеров, ограниченно используемых в клинической практике для сывороточной диагностики поздних стадий опухолей толстой кишки: раковоэмбрионального антигена, полисахарида СА 19-9 и белка TIMP-1 [13]. Несколько потенциальных белковых маркеров проходят клинические испытания. Использование  $\alpha$ -дефензина 5 в серологической диагностике опухолей толстой кишки имеет несколько преимуществ: крайне низкое содержание маркера в сыворотке здоровых доноров; специфическая экспрессия маркера в нормальных клетках только одного типа (клетки Панета); быстрое (до 50 раз) и частое (в 80% случаев) повышение уровня синтеза и секреции маркера на ранних стадиях канцерогенеза (при возникновении аденом) [14]. Тем не менее, использование  $\alpha$ -дефензина 5 (как и гомологичного белка того же семейства — дефензина 6) в клинической практике перспективно лишь в случае неинвазивной диагностики аде-

ном тонкой и толстой кишки перед проведением хирургического вмешательства. Это связано с тем, что оба маркера обнаруживаются только в 17% аденокарцином, в которых его содержание в среднем в 10 раз ниже, чем в аденомах [4]. Применение с этой целью кишечных дефензинов потребует заметного повышения чувствительности анализа (например, при помощи иммуно-ПЦР или метода, основанного на использовании наночастиц, меченных штрих-кодом) [15, 16].

Настоящая работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки (ГК №14.740.11.0757, ГК №16.552.11.7034) и Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-01023-а). Часть экспериментов была выполнена на приборной базе ЦКП “Теном” ИМБ РАН, поддерживаемого Госконтрактом № 16.552.11.7034.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang K., Lee I., Carlson G., et al. 2010. Systems biology and the discovery of diagnostic biomarkers. *Dis. Markers*. **28**, 199–207.
2. Букурова Ю.А., Никитина С.Л., Ханкин С.Л., Краснов Г.С., Лисицын Н.А., Карпов В.Л., Берестень С.Ф. 2011. Поиск белковых маркеров для сывороточной диагностики опухолей на основе анализа профилей экспрессии микроРНК. *Молекуляр. биология*. **45**, 376–381.
3. Lisitsyn N.A., Bukurova Y.A., Nikitina I.G., et al. 2012. Enteric alpha defensins in norm and pathology. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **11**, 1.
4. Joo M., Shafsafaei A., Odze R.D. 2009. Paneth cell differentiation in colonic epithelial neoplasms: evidence for the role of the Apc/beta-catenin/Tcf pathway. *Hum. Pathol.* **40**, 872–880.
5. Radeva M.Y., Jahns F., Wilhelm A., et al. 2010. Defensin alpha 6 (DEFA 6) overexpression threshold of over 60 fold can distinguish between adenoma and fully blown colon carcinoma in individual patients. *BMC Cancer*. **10**, 588.
6. Краснов Г.С., Ханкин С.Л., Букурова Ю.А., и др. 2009. Протеом злокачественных опухолей толстой кишки человека: идентификация растворимых белков с повышенным содержанием в опухоли. *Молекуляр. биология*. **43**, 610–615.

7. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–685.
8. Schägger H., von Jagow G. 1987. Tricine-sodium sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368–379.
9. Rajabi M., de Leeuw E., Pazgier M., et al. 2008. The conserved salt bridge in human alpha-defensin 5 is required for its precursor processing and proteolytic stability. *J. Biol. Chem.* **283**, 21509–21518.
10. Ghosh D., Porter E., Shen B., et al. 2002. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat. Immunol.* **3**, 583–590.
11. Elphick D., Liddell S., Mahida Y.R. 2008. Impaired luminal processing of human defensin-5 in Crohn's disease: persistence in a complex with chymotrypsinogen and trypsin. *Am. J. Pathol.* **172**, 702–713.
12. Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., et al. 1985. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complex by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods.* **77**, 305–319.
13. Tanaka T., Tanaka M., Tanaka T., et al. 2010. Biomarkers for colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 3209–3225.
14. Joo M., Shahsafaei A., Odze R.D. 2009. Paneth cell differentiation in colonic epithelial neoplasms: evidence for the role of the Apc/beta-catenin/Tcf pathway. *Hum. Pathol.* **40**, 872–880.
15. Malou N., Raoult D. 2011. Immuno-PCR: a promising ultrasensitive diagnostic method to detect antigens and antibodies. *Trends Microbiol.* **19**, 295–302.
16. Thaxton C.S., Elghanian R., Thomas A.D., et al. 2009. Nanoparticle-based bio-barcode assay redefines “undetectable” PSA and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 18437–18442.