

На правах рукописи

СМИРНОВ

Илья Валерьевич

**СОЗДАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К
ЭНДОГЛИНУ, МАРКЕРУ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И
ЭНДОТЕЛИЯ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург, и Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий», Санкт-Петербург.

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Климович Владимир Борисович

руководитель лаборатории гибридной технологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

доктор биологических наук, академик РАН, профессор

Никольский Николай Николаевич

заведующий отделом внутриклеточной сигнализации и транспорта Федерального государственного бюджетного учреждения «Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук

Киселева Екатерина Прохоровна

руководитель лаборатории иммунорегуляции отдела иммунологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

кандидат биологических наук

Смирнова Татьяна Дмитриевна

ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных культур Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится “ 31 ” марта 2017 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4.

E-mail: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

Сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Факс: 8 (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте Института.

Автореферат разослан “ ” 2016 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Эндоглин (CD105) представляет собой гомодимерный мембранный гликопротеин I типа. Молекулярный вес мономеров составляет 90-95 кДа, димеров – около 180 кДа. Эндоглин является компонентом трех рецепторных комплексов: TGF- β , BMP и активина. В их составе он способен взаимодействовать с рядом растворимых факторов: с TGF- β 1,- β 3, BMP-2, -7, -9, -10 и активином А.

Эндоглин преимущественно экспрессирован на поверхности клеток эндотелия кровеносных сосудов и мезенхимных стволовых клеток (МСК) (Gougos, Letarte, 1988). Плотность молекул рецептора на мембране клеток эндотелия существенно возрастает под действием гипоксии (Zhu et al., 2003; Tian et al., 2010). Эндоглин принимает участие в регуляции процессов эмбрионального (Li et al., 1999), репаративного (Valluru et al., 2011) и опухолевого ангиогенеза (Seon et al., 1997; Tsujie et al., 2006). Этот антиген обнаруживают на поверхности клеток рака пищевода, предстательной и молочной желез. Изменения плотности молекул CD105 на мембране этих клеток взаимосвязаны с их миграционной и метастатической активностью (Liu et al., 2002; Oxmann et al., 2008).

Растворимая форма эндоглина образуется в результате протеолитического расщепления рецептора посредством матриксной металлопротеиназы-14 (ММР-14). Фрагменты экстраклеточной части молекулы обнаруживают в плазме крови и моче. Измерения концентрации растворимого эндоглина в биологических жидкостях используют для мониторинга роста и метастатической активности опухолей у онкологических больных (Takahashi et al., 2001), оценки вероятности развития преэклампсии у беременных женщин (Romero et al., 2008) и прогноза течения атеросклеротических процессов (Cui et al., 2008).

Моноклональные антитела (МКАТ) к эндоглину человека нашли широкое применение в фундаментальных и прикладных исследованиях. Их используют в проточной цитофлуориметрии для идентификации МСК и клеток сосудистого эндотелия. Рост злокачественных новообразований вызывает локальную гипоксию тканей

и усиление экспрессии эндоглина питающими их сосудами. Благодаря разнице в плотностях молекул CD105 с помощью специфичных МКАТ возможна дифференциация сосудов нормальных и неопластических тканей при иммуногистохимических исследованиях биопсий солидных опухолей различного гистогенеза.

Внутрисосудистая локализация эндоглина обеспечивает его доступность для вводимых внутривенно реагентов. Полученные на основе МКАТ разнообразные конъюгаты рассматривают в качестве средств для неинвазивной диагностики онкологических заболеваний (Korpany et al., 2007) и направленной доставки цитотоксинов в опухоли (Muñoz et al., 2007). Гуманизированные реагенты проходят клинические испытания (I фаза) в качестве анти-ангиогенных препаратов при ряде онкологических заболеваний (Rosen et al., 2012).

Несмотря на большое количество созданных в западных лабораториях МКАТ к эндоглину, лишь немногие из них охарактеризованы с достаточной полнотой (Pichuantes et al., 1997). Сведений о подобных реагентах, полученных на территории Российской Федерации, нет. Большинство существующих гибридом создано с использованием в качестве доноров иммунных лимфоцитов мышей линии BALB/c. В результате репертуар эпитопных специфичностей полученных МКАТ ограничен иммунным ответом этих животных. Накопленный в лаборатории опыт создания гибридом с использованием мышей SJL/J и F1(SJL/J×BALB/c) свидетельствует о том, что получаемые на основе репертуара их иммунного ответа МКАТ по своей специфичности дополняют реагенты, происходящие от мышей BALB/c (Климович и др., 1999).

Цель и задачи исследования

Цель исследования состояла в создании и характеристике нового семейства МКАТ, распознающих как мембранную, так и растворимую формы эндоглина. В соответствии с целью работы были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить и охарактеризовать препараты рекомбинантных молекул эндоглина. Исследовать их иммуногенность для мышей F1(SJL/J×BALB/c);
2. На основе иммунных лимфоцитов мышей F1(SJL/J×BALB/c) создать но-

вое семейство гибридом-продуцентов МКАТ к эндоглину;

3. Исследовать иммунохимические свойства полученных реагентов и определить области их применения;

4. Создать и охарактеризовать двухцентровую систему иммуноферментного анализа (ИФА) для количественного определения растворимой формы эндоглина;

5. Исследовать возможности полученных реагентов в качестве инструментов для изучения роли эндоглина в биологии клеток.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Рекомбинантные фрагменты эндоглина человека, полученные в клетках бактерий и млекопитающих, обладают высокой иммуногенностью для мышей F1(SJL/J×BALB/c). Однако антитела, распознающие мембранную форму антигена, могут быть обнаружены в сыворотках крови только тех животных, которых иммунизировали белком, синтезированным в клетках млекопитающих.

2. С применением двух скрининговых методик, основанных на выявлении антител к рекомбинантным полипептидам или молекулам антигена на мембране клеток гепатокарциномы НЕР G2, создано 12 гибридом-продуцентов МКАТ к эндоглину.

3. Исследование иммунохимических свойств полученных МКАТ показало, что они направлены к десяти конформационным и двум линейным детерминантам. Пять реагентов специфичны к пространственно изолированным эпитопам. Семь МКАТ распознают детерминанты, имеющие частичное перекрывание между собой.

4. Различные пары МКАТ выявляют разное содержание растворимого эндоглина в плазме крови человека. Двухцентровая система ИФА, созданная на основе двух реагентов (4Е4 и 4С9), выявляет наибольшие уровни антигена в образцах. Определяемые с ее помощью значения концентрации эндоглина в плазме крови доноров в среднем на два порядка выше, чем в широко используемом коммерческом наборе.

5. Полученные МКАТ могут быть использованы в фундаментальных и прикладных исследованиях. Они позволяют проводить иммуноаффинное выделение

молекул эндоглина, их детекцию методами вестерн-блота и двухцентрового ИФА, а также выявление экспрессии CD105 на мембранах клеток с помощью методов точной цитофлуориметрии, иммунофлуоресценции и иммуногистохимии.

Научная новизна полученных результатов

В качестве доноров иммунных спленоцитов для получения гибридом-продуцентов МКАТ против эндоглина впервые были использованы мыши F1(SJL/J×BALB/c). Исследование реактивности полученных МКАТ с рекомбинантными молекулами эндоглина и сопоставление полученных результатов с данными литературы показало, что репертуар эпитопных специфичностей иммунного ответа этих животных отличается от такового у мышей линии BALB/c.

С использованием различных двухцентровых систем ИФА показано, что уровень растворимого эндоглина в плазме крови человека существенно выше, чем считалось ранее. Система ИФА, основанная на МКАТ 4Е4 и 4С9, позволяет выявлять в среднем на два порядка большие уровни эндоглина, чем аналогичный широко применяемый коммерческий набор. С помощью метода вестерн-блота показана молекулярная гетерогенность антигена, находящегося в периферической крови и культуральной жидкости клеток эндотелия человека. Данные денситометрического анализа свидетельствуют о том, что значения концентрации эндоглина, полученные в системе 4Е4-4С9, существенно ближе к истинному содержанию антигена, чем величины, определенные в коммерческом наборе.

Созданные двухцентровые системы ИФА обладают высокой чувствительностью к молекулам растворимого эндоглина. Это позволяет отслеживать накопление антигена в культуральной среде клеток эндотелия и МСК. Прежде для этих целей использовали трудоемкие методы иммунопреципитации и вестерн-блота.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты, полученные в работе, свидетельствуют о необходимости пересмотра существующих представлений об уровне растворимого эндоглина в плазме крови человека.

Практическая значимость работы состоит в создании первой на территории Российской Федерации панели МКАТ, обеспечивающей выявление эндоглина с помощью методов вестерн-блота, иммуногистохимии, иммунофлуоресценции и проточной цитофлуориметрии. Разработана и охарактеризована двухцентровая система ИФА, позволяющая проводить количественное определение содержания эндоглина в плазме крови доноров. Ее качественные характеристики превосходят параметры широко применяемого коммерческого аналога. Созданные реагенты и тест-системы могут быть использованы как в прикладных, так и в фундаментальных исследованиях.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 3 статьи (2 статьи в рецензируемых научных журналах из перечня ВАК и 1 статья в рецензируемом иностранном журнале) и 5 тезисов. Поданы две заявки на изобретения, по одной из них выдан патент, по другой – принято положительное решение.

Личный вклад автора

Большинство описанных в работе экспериментов, обработка их результатов и подготовка публикаций выполнены автором лично. Соавторы публикаций проводили обучение методам культивирования, гибридизации, иммунохимического анализа, а также оказывали помощь при проведении экспериментов, анализе их результатов и подготовке публикаций. Иммуногистохимические исследования биопсийного материала выполнены сотрудником ФГБУ «РосНИИГТ ФМБА России» к.б.н. Семеновой Н.Ю. Образцы плазмы крови здоровых доноров, здоровых беременных женщин и женщин с преэклампсией были любезно предоставлены коллегами из отдела иммунологии ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» д.б.н. Соколовым Д.И. и д.м.н., проф., член-корр. РАЕН Сельковым С.А. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научными руководителями.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 161 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 383 источника. Работа иллюстрирована 40 рисунками и 10 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение рекомбинантных молекул эндоглина. Синтез кДНК-матрицы для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) осуществляли на основе РНК, изолированной из культуры МСК жировой ткани человека. Клонлируемые фрагменты гена эндоглина лигировали в вектора pQE-30 и pET-21b(+). Экспрессию белков Eng-fg и Eng-C проводили в клетках *E.coli* штаммов M15[pREP4] и BL-21(DE3), соответственно. Очистку рекомбинантных белков вели в буфере с мочевиной на металл-аффинной колонке.

Протоколы иммунизации мышей рекомбинантными молекулами эндоглина. Для проведения иммунизаций использовали мышей ♀F1(SJL/J×BALB/c). Синтезированные в клетках *E.coli* или мышшиной миеломы рекомбинантные белки эмульгировали в полном адьюванте Фрейнда. Первичная иммунизация состояла в подкожном введении по 2-3 мкг антигена каждому животному. Повторную иммунизацию проводили спустя 1 мес. путем внутрибрюшинного введения тех же антигенов в неполном адьюванте Фрейнда. Мышам-донорам селезенок за 72 и за 48 ч до спленэктомии делали внутрибрюшинные инъекции антигена в ФСР.

Создание гибридом и получение МКАТ к эндоглину. Слияние спленоцитов и клеток мышшиной миеломы SP2/0-Ag14 проводили по методу Гальфре. Гибридомы-продуценты антител к эндоглину клонировали методом лимитирующих разведений. Отобранные стабильные гомогенные культуры клеток наращивали в массовой культуре и вводили в брюшные полости мышей F1(SJL/J×BALB/c), получивших инъекции пристана. Очистку МКАТ вели на колонке с протеином G.

Иммунохимические методы, использованные для выявления молекул эндоглина и специфичных к ним антител. Выявление антител к эндоглину и исследование их иммунохимических свойств проводили с помощью непрямого ИФА с адсорбированными на твердую фазу рекомбинантными молекулами антигена (Eng-C или Eng-NS0) и в ИФА на фиксированных глютаральдегидом клетках, экспрессирующих CD105.

Для исследования взаимной локализации детерминант, распознаваемых МКАТ, использовали конкурентный вариант ИФА на клетках НЕР G2. Растворы меченных пероксидазой и немеченых МКАТ смешивали 1:1 и инкубировали в лунках с клетками. За 0% ингибирования принимали величину оптической плотности в лунках

без ингибирующих реагентов, за 100% – оптическую плотность в лунках, содержащих 10 мкг/мл одноименных немеченых МКАТ.

Сравнение уровней экспрессии эндоглина различными культурами клеток с помощью полученных МКАТ проводили в ИФА. Клетки засеивали в 96-луночные планшеты таким образом, чтобы их конфлюент достигал 95-100% к моменту проведения опыта. Все планшеты содержали референтную культуру клеток гепатокарциномы НЕР G2.

Для определения концентрации растворимого эндоглина использовали метод двухцентрового ИФА. В качестве калибратора был использован коммерческий препарат рекомбинантного эндоглина (Eng-NS0). Образцы плазм крови здоровых доноров, здоровых беременных женщин (37-38 нед.) и женщин с преэклампсией (37-38 нед.) были любезно предоставлены коллегами из отдела иммунологии ФГБУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродукции им. Д.О. Отта».

Электрофорез белков проводили в буфере Laemmli в полиакриламидных гелях (7.5-10%). Перед исследованием образцы смешивали с 2× буфером и подвергали нагреванию до +90°C. Перенос белков из гелей на нитроцеллюлозные мембраны проводили полусухим методом в буфере Towbin.

Для иммуноаффинного выделения растворимого эндоглина МКАТ 2С8 иммобилизовали на активированной бромом сефарозе. Молекулы антигена элюировали с помощью цитрат-фосфатного буфера (рН 3.6).

Выявление экспрессии эндоглина культивируемыми клетками осуществляли с помощью проточной цитофлуориметрии. Связывание первичных антител с антигеном на мембране выявляли посредством поликлональных козьих антител против иммуноглобулинов мыши, меченных флуоресцеином.

Визуализацию экспрессии эндоглина на клеточной мембране проводили с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции. Клеточные культуры выращивали на покровных стеклах, покрытых желатиной. Фиксацию клеток проводили 70° этанолом. Окраску ядер клеток выполняли с помощью раствора йодида пропидия.

Культуры клеток млекопитающих, использованные в работе. Культуры МСК подкожной жировой ткани человека были получены в лаборатории (Пиневич и др., 2014). Перевиваемые клетки гепатокарциномы НЕР G2 получены из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ. Клетки эмбриональной почки человека НЕК293 и миеломные клетки мыши SP2/0-Ag14 получены из коллекции ФГБУН «Институт цитологии РАН». Линия клеток эндотелия человека EA.hy926 была предоставлена проф. И.С. Фрейдлин с любезного разрешения автора (Edgell et al., 1983).

Жизнеспособность клеток оценивали в параллельных экспериментах посредством двух методов: окраски с помощью рекомбинантного аннексина V, конъюгированного с флуоресцеином, в сочетании с 7-амино-актиномицином D и окраски флуоресцеин-диацетатом с йодидом пропидия.

Референтные реагенты и наборы. Рекомбинантные молекулы эндоглина (1097-EN-025, R&D Systems, США), синтезированные клетками мышиной миеломы NS0

(Eng-NS0), были использованы в качестве иммуногена, антигена при проведении иммунохимической характеристики реагентов и калибрующего реагента во всех двухцентровых системах ИФА.

Определение содержания растворимой формы эндоглина в образцах плазмы крови человека наряду с разработанными в лаборатории системами двухцентрового ИФА осуществляли с помощью коммерческого набора Human Endoglin/CD105 Quantikine ELISA Kit (DNDG00, R&D Systems, США).

В качестве референтного МКАТ к эндоглину использовали коммерческий реагент SN6h (MA5-11854, Thermo Fisher Scientific, США). Распознаваемый ими эпитоп локализован в пределах последовательности Ala119-Pro231.

Методы статистической обработки и визуализации данных. Статистический анализ данных проводили с помощью языка программирования R (версия 3.3.0). Для их визуализации использовали графические пакеты ggplot2 и cowplot.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Получение, характеристика и исследование иммуногенности рекомбинантных молекул эндоглина

Для иммунизации мышей и проведения ИФА в лаборатории в клетках *E.coli* были синтезированы рекомбинантные белки Eng-C и Eng-fr, которые воспроизводили последовательности экстраклеточного участка молекулы эндоглина (Glu26-Gly586) и его центрального фрагмента (Val234-Leu487). Эти пептиды были мономерными и не содержали углеводного компонента. Для этих же целей был использован коммерческий рекомбинантный пептид, синтезированный в клетках мышиной миеломы NS0 (Eng-NS0). Он, как и Eng-C, воспроизводил последовательность экстраклеточного домена эндоглина (Glu26-Gly586), но имел димерную структуру и характерные для белков млекопитающих фолдинг и гликозилирование.

Мышей F1(SJL/J×BALB/c) иммунизировали одним из трех рекомбинантных пептидов. Независимо от используемого иммуногена в сыворотках животных с помощью метода ИФА были выявлены антитела, взаимодействовавшие с белком бактериального происхождения Eng-C. Эти результаты свидетельствовали о высокой иммуногенности всех трех рекомбинантных пептидов. В ИФА на экспрессирующих эндоглин клетках НЕР G2 показано, что иммуноглобулины, специфичные к мембранной форме антигена, присутствовали только в сыворотках мышей, которых

иммунизировали синтезированным в клетках млекопитающих пептидом Eng-NS0 (рис. 1).

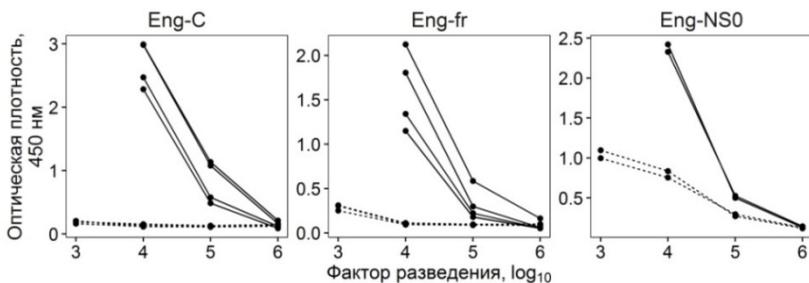


Рис. 1. Графики титрования сывороток мышей, иммунизированных Eng-C, Eng-fr и Eng-NS0 при исследовании в ИФА с адсорбированным на твердую фазу Eng-C (сплошные линии) или на фиксированных клетках HEP G2 (пунктирные линии).

2. Создание гибридом-продуцентов МКАТ к эндоглину человека

В качестве доноров спленоцитов для гибридизации были выбраны мыши, иммунизированные молекулами Eng-NS0. Суспензию полученных от них клеток разделили на две части и использовали в двух последовательных экспериментах по гибридизации с миеломными клетками SP2/0-Ag14. В первом опыте скрининг ростовых сред гибридом вели в ИФА с адсорбированным на твердую фазу белком Eng-C. Во втором опыте антитела выявляли с помощью ИФА на клетках HEP G2. В результате процедур клонирования и повторных тестирований получено 12 культур гибридом. В первом эксперименте были созданы штаммы клеток 2E1, 4B7, 4C9, 4E4 и 4G8, во втором – штаммы гибридом 1B4, 2C8, 3G2, 5B6, 5G7, 5F1 и 5H7.

3. Исследование иммунохимических свойств полученных МКАТ к эндоглину и определение областей их применения

Антигенсвязывающие способности полученных МКАТ были исследованы в ИФА с адсорбированными на твердую фазу молекулами Eng-C или Eng-NS0 и в ИФА на клетках HEP G2. Все реагенты взаимодействовали с полученными в клетках бактерий и млекопитающих рекомбинантными белками Eng-C и Eng-NS0. Антиген на мембране клеток распознавали все МКАТ за исключением 2E1 и 4B7.

Для исследования вторичной структуры распознаваемых МКАТ эпитопов эндоглина был проведен ИФА с адсорбированными на твердую фазу молекулами Eng-NS0 в одной из трех форм: 1) нативной, 2) подвергнутой тепловой денатурации или 3) подвергнутой восстановлению дисульфидных связей с помощью β -меркаптоэтанола. Антитела 2E1 и 4B7 одинаково эффективно взаимодействовали с антигеном во всех трех формах. Напротив, связывание остальных реагентов с измененными молекулами Eng-NS0 было существенно ниже, чем с интактным антигеном (**рис. 2**). Таким образом, установлено, что реагенты 2E1 и 4B7 направлены к линейным детерминантам, а десять других МКАТ специфичны к эпитопам, структура которых зависит от конформации антигена.

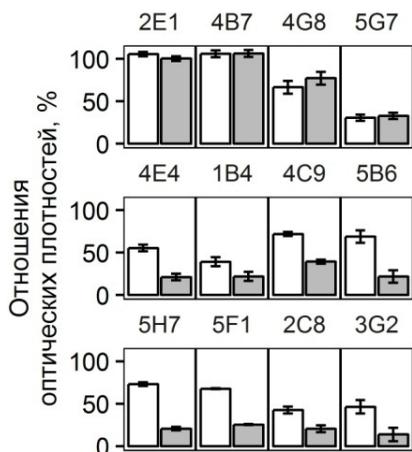


Рис. 2. Связывание МКАТ с нативным и денатурированным рекомбинантным белком Eng-NS0. Результаты повторенного дважды опыта представлены в виде усредненных отношений оптических плотностей, измеренных в лунках с измененным и с интактным антигеном. Светлые столбцы обозначают реактивность МКАТ с Eng-NS0, денатурированным нагреванием, серые столбцы – реактивность антител с антигеном после восстановления дисульфидных связей, барты – стандартные отклонения средних.

Определено взаимное расположение распознаваемых МКАТ эпитопов эндоглина. Реагенты 2E1 и 4B7 взаимодействовали с полноразмерными молекулами Eng-C, тогда как с короткими пептидами Eng- fr (Val234-Leu487), воспроизводившими центральный участок эндоглина, связывались только антитела 2E1. Эти данные свидетельствуют о том, что рассматриваемые реагенты направлены к двум удаленным друг от друга эпитопам. Взаимное расположение детерминант, распознаваемых остальными МКАТ, установили с помощью метода конкурентного ИФА на клетках НЕР G2. Показано, что антитела 3G2, 4C9 и 4G8 специфичны к трем изолированным эпитопам эндоглина. Детерминанты, распознаваемые семью другими реаген-

тами, имели частичное перекрытие между собой (**рис. 3**).

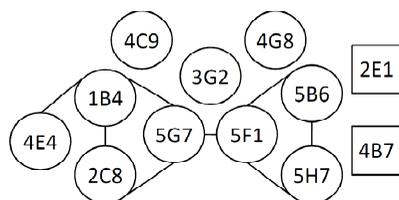


Рис. 3. Схема взаимного расположения сайтов связывания МКАТ в молекуле эндоглина. Линии соединяют частично перекрывающиеся эпитопы. Квадратами обозначены линейные детерминанты, кругами – конформационные.

Антитела к линейным эпитопам 2E1 и 4B7 были использованы в качестве выявляющих реагентов для вестерн-блота. Оба реагента взаимодействовали как с димерными, так и с мономерными молекулами Eng-NS0, перенесенными на нитроцеллюлозную мембрану (**рис. 4**). Выявление экспрессии эндоглина на гистологических срезах кавернозной гемангиомы и лимфатического узла пациента, страдавшего лимфорпролиферативным заболеванием (болезнью Каствлемана), проводили с помощью МКАТ 2E1. На соседних срезах с помощью коммерческих реагентов выявляли экспрессию эндотелиальных маркеров CD31 и CD34 (**рис. 5**). На всех препаратах отмечено окрашивание клеток эндотелия кровеносных сосудов.

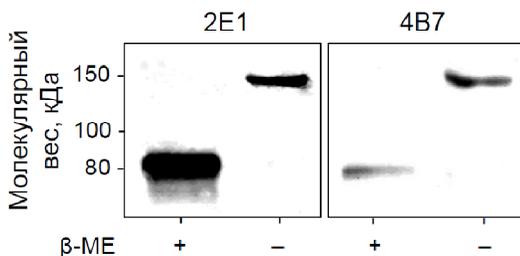


Рис. 4. Выявление рекомбинантного антигена (Eng-NS0) методом вестерн-блота с помощью МКАТ 2E1 и 4B7. Восстановление дисульфидных связей в антигене проводили посредством β-меркаптоэтанола.

МКАТ к конформационным эпитопам эндоглина были использованы для выявления антигена на мембранах клеток человека. Сравнение уровней экспрессии эндоглина на МСК, клетках эндотелия EA.hy926, гепатокарциномы HEP G2 и клетками эмбриональной почки человека HEK293 проводили с помощью метода ИФА. Величины оптических плотностей в лунках с клетками HEP G2 были использованы в качестве референтных значений и приняты за 1. МСК и клетки эндотелия EA.hy926 обладали высокими уровнями экспрессии эндоглина. Напротив, ни один реагент не взаимодействовал с мембраной клеток HEK293 (**рис. 6**). Эти результаты были подтверждены с помощью метода проточной цитофлуориметрии с коммерче-

скими МКАТ к эндоглину.

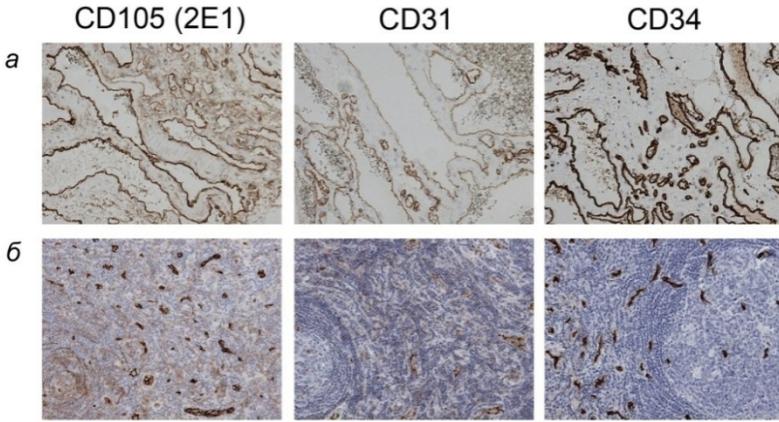


Рис. 5. Выявление экспрессии эндоглина и панэндотелиальных маркеров (*CD31* и *CD34*) на гистологических срезах кавернозной гемангиомы (**а**) и лимфатического узла пациента с болезнью Кастрлемана (**б**). Увеличение 200×.

Полученные МКАТ к конформационным эпитопам также позволяли выявлять эндоглин на мембране клеток EA.hy926 методом проточной цитофлуориметрии (**рис. 7**). Созданные реагенты были использованы для локализации экспрессии антигена на клетках с помощью метода иммунофлуоресценции (**рис. 8**). Специфичное окрашивание отмечено на мембранах клеток эндотелия EA.hy926 и гепатокарциномы HEP G2. На поверхности клеток HEK293 экспрессии антигена не выявлено.

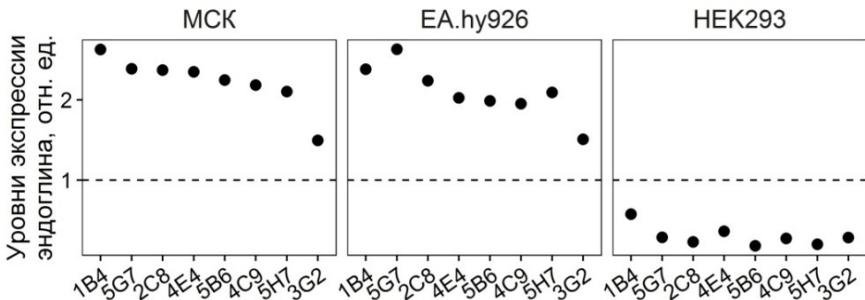


Рис. 6. Сравнение экспрессии эндоглина культурами клеток человека с помощью метода ИФА. Горизонтальной пунктирной линией обозначены уровни экспрессии антигена клетками HEP G2.

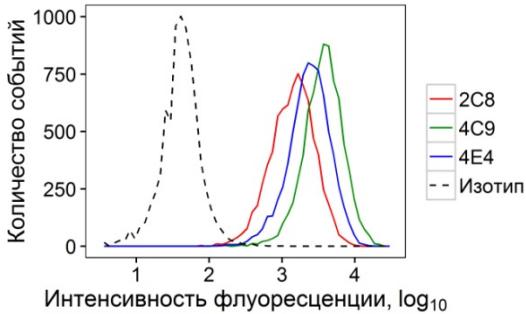


Рис. 7. Выявление экспрессии эндоглина на мембранах клеток EA.hy926 с помощью полученных МКАТ методом проточной цитофлуориметрии. В качестве примера приведены результаты, полученные с помощью МКАТ 2С8, 4Е4 и 4С9.

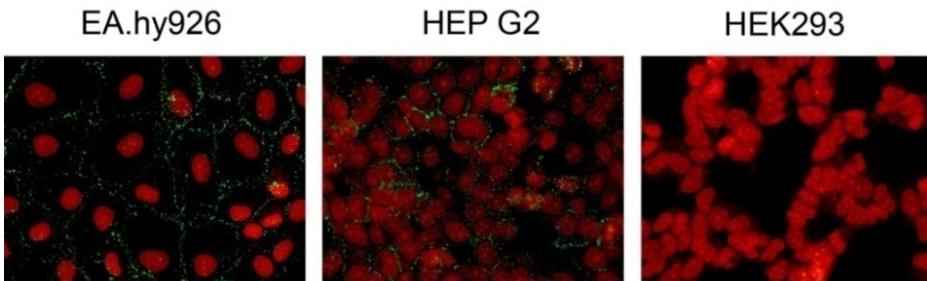


Рис. 8. Локализация экспрессии эндоглина на мембранах клеток эндотелия EA.hy926 и гепатокарциномы HEP G2 (зеленое свечение) методом иммунофлуоресценции с применением МКАТ 4С9. Ядра окрашены йодидом пропидия (красное свечение). Об. 20×.

4. Создание двухцентральной системы ИФА для количественного определения растворимой формы эндоглина

Для выявления и оценки концентрации растворимого эндоглина была создана и исследована серия двухцентральных систем ИФА. В качестве их компонентов использовали МКАТ, направленные к пространственно разобщенным детерминантам, и референтный реагент SN6h. Одни из них адсорбировали на твердую фазу, а другие антитела, меченные пероксидазой хрена, использовали в качестве выявляющих реагентов. На основании результатов исследования серийных разведений Eng-NS0 выбрано 12 сочетаний МКАТ, демонстрировавших наибольшую чувствительность к антигену. С их помощью определяли содержание растворимого эндоглина в двух объединенных образцах плазмы крови. Один из них получен от здоровых доноров,

другой – от беременных женщин, страдавших преэклампсией. Коммерческий набор для определения концентрации растворимого эндоглина (R&D Systems) служил референтной системой. Оценки содержания антигена в одних и тех же образцах, полученные с помощью разных пар реагентов, существенно различались. Наибольшие величины концентрации антигена были определены с помощью пар реагентов 4E4-4C9 и SN6h-4E4, включавшей референтный реагент. Эти значения были в 50-100 раз больше концентраций, определенных с помощью коммерческого набора (рис. 9).

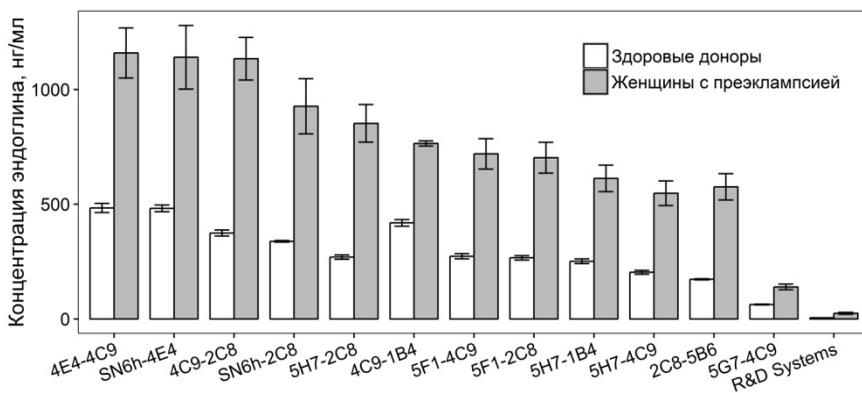


Рис. 9. Определение содержания эндоглина с помощью различных пар МКАТ и коммерческого набора R&D Systems в двух пулированных образцах плазмы крови, один из которых получен от здоровых доноров, другой – от пациенток с преэклампсией. Все измерения выполнены трижды. Бары показывают стандартные отклонения.

Для верификации антигенных специфичностей созданных систем двухцентрового ИФА и референтного набора был проведен опыт, в котором с помощью метода иммунопреципитации с МКАТ 2C8 из исследуемых образцов плазмы крови удаляли специфичный антиген. Истощенные образцы и собранные с колонки элюаты анализируют с помощью изучаемых иммуноферментных систем и референтного набора. Ни в одной системе не выявлено присутствия антигена в истощенных образцах. Напротив, все они детектировали наличие в элюатах до 90% от исходного количества антигена.

Молекулы эндоглина, выделенные методом иммунопреципитации из образцов

плазмы крови здоровых доноров и пациенток с преэклампсией, исследовали с помощью метода вестерн-блота. Образцы готовили таким образом, чтобы они содержали по 200 нг антигена согласно оценке, сделанной в системе 4E4-4C9, или по 2.6 нг антигена – согласно референтному набору. На соседние четыре дорожки геля нанесли образцы рекомбинантного калибратора (Eng-NS0). Выявление молекул эндоглина осуществляли с помощью МКАТ 2E1. Образцы плазмы крови содержали несколько фракций антигена (**рис. 10**). Полоса белка с молекулярным весом 90 кДа (выявлена только в образце, полученном от женщин с преэклампсией), по всей видимости, соответствовала полноразмерным молекулам эндоглина. Фракция А имела тот же молекулярный вес (81 кДа), что и Eng-NS0, воспроизводивший последовательность экстраклеточного домена рецептора. Вероятнее всего, молекулы антигена из этой фракции представляли собой аналогичный фрагмент рецептора. Около трех четвертей антигена сосредоточено во фракции В (70 кДа) и до 15% молекул антигена входит в состав фракции С (62 кДа).

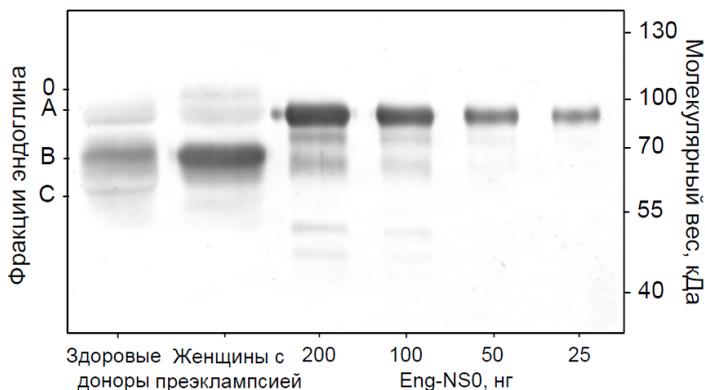


Рис. 10. Исследование эндоглина, выделенного из пулированных образцов плазмы крови здоровых доноров и женщин с преэклампсией, методом вестерн-блота.

С применением денситометрического анализа показано, что на дорожках, содержащих молекулы эндоглина, выделенные из плазмы крови здоровых доноров или женщин с преэклампсией, выявлено 140 или 230 нг антигена, соответственно. Эти значения были существенно ближе к оценкам, сделанным в системе 4E4-4C9

(200 нг), чем к величинам, полученным с помощью референтного набора (2.6 нг).

С помощью исследуемых иммуноферментных систем была произведена оценка содержания эндоглина в индивидуальных образцах плазмы крови, полученных от здоровых доноров, здоровых беременных женщин и беременных женщин с преэклампсией. Несмотря на различия в оценках концентраций антигена, разные системы ИФА выявляли отличающиеся уровни растворимого эндоглина в образцах, принадлежавших трем группам доноров. Значения концентраций антигена в плазме крови здоровых доноров были ниже, чем у здоровых беременных женщин, тогда как у пациенток с преэклампсией отмечена интенсивная продукция растворимого эндоглина. На **рис. 11** в качестве примера приведены данные, полученные с помощью системы 4E4-4C9 и референтного набора, в которых были определены наибольшие и наименьшие уровни эндоглина, соответственно. Все варианты иммуноферментных систем характеризовались высокой диагностической точностью (>0.84) для преэклампсии.

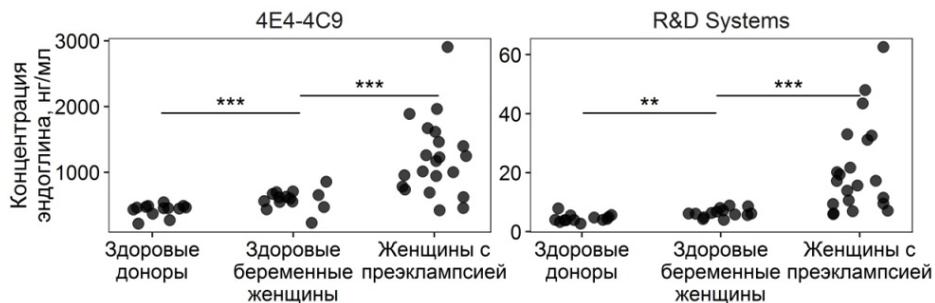


Рис. 11. Оценка концентраций растворимого эндоглина в индивидуальных образцах плазмы крови доноров с использованием системы 4E4-4C9 и коммерческого набора. ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, критерий Манна-Уитни.

5. Возможности применения созданных МКАТ к эндоглину в качестве инструментов для изучения биологии клеток

При проведении экспериментов были использованы клетки EA.hy926, обладавшие основными характеристиками эндотелия, и две первичные культуры МСК человека (МСК-6 и МСК-16), полученные из подкожной жировой клетчатки молочной

железы и висцерального жира, соответственно. Три культуры клеток отличались ростовыми характеристиками и уровнями экспрессии эндоглина. Оптимальная концентрация МКАТ (5 мкг/мл) была подобрана в опыте, который показал уровни насыщения рецепторов клеток эндотелия.

Экспрессия молекул CD105 на мембране клеток лабильна и может изменяться в зависимости от условий культивирования (Киселева и др., 2016). Для выявления этих изменений клетки эндотелия EA.hy926 и МСК культивировали в трех режимах: 1) в стационарной фазе роста без смены ростовой среды; 2) в стационарной фазе с однократным обновлением ростовой среды; 3) в фазе логарифмического роста, поддерживаемой путем пересева. Через 6 сут проводили анализ экспрессии эндоглина на мембране клеток с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Клетки EA.hy926 обладали практически неизменной экспрессией CD105. Напротив, плотность молекул эндоглина на мембране МСК зависела от условий их культивирования (рис. 12).

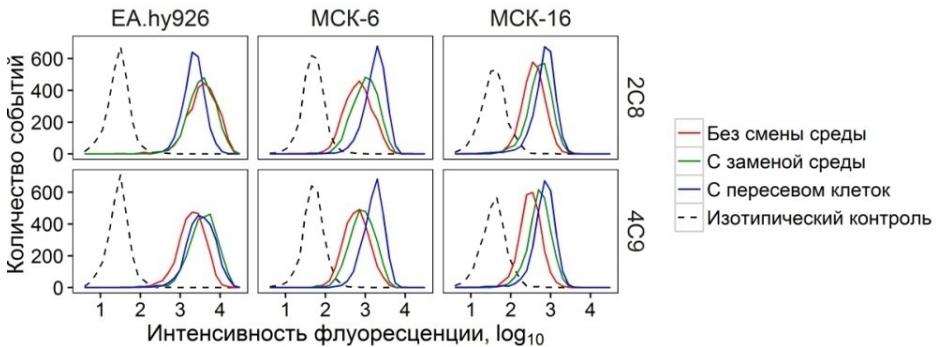


Рис. 12. Влияние режимов культивирования клеток эндотелия EA.hy926 и МСК на уровни экспрессии молекул эндоглина на их мембранах. Для выявления CD105 использовали МКАТ 2С8 или 4С9.

Полученные МКАТ к эндоглину использовали для исследования динамики обновления молекул антигена на мембране клеток. Находившиеся в логарифмической фазе роста клетки инкубировали в среде с антителами 2С8, 4Е4 или 4С9 в течение 1 ч. Не связавшиеся реагенты удаляли, после чего продолжали культивирование клеток в среде без антител. Выявление связанных с мембраной клеток МКАТ проводи-

ли методом проточной цитофлуориметрии посредством козьих антител к иммуноглобулинам мыши, меченных флуоресцеином. В ходе эксперимента уровни флуоресценции клеток существенно снижались. Эти данные отображали процесс обновления молекул эндоглина. Его интенсивность оказалась существенно выше у клеток эндотелия EA.hy926 по сравнению с МСК (рис. 13).

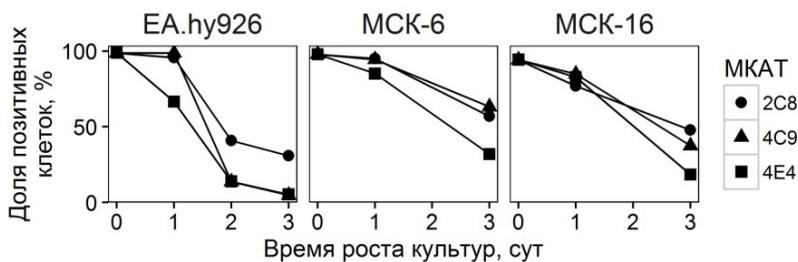


Рис. 13. Графики изменения долей позитивных клеток, меченных МКАТ 2С8, 4С9 или 4Е4, вследствие обновления молекул эндоглина.

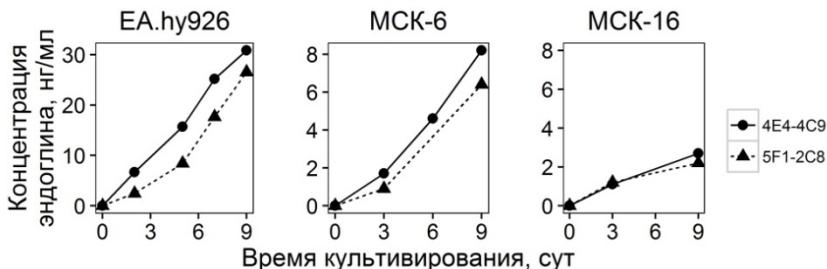


Рис. 14. Динамика накопления эндоглина в культуральной среде клеток эндотелия EA.hy926 и МСК жировой ткани человека. Определение концентраций антигена выполняли в системах двухцентрового ИФА 4Е4-4С9 или 5F1-2С8.

Созданные двухцентровые иммуноферментные системы использовали для количественной характеристики процесса накопления растворимого эндоглина в ростовых средах клеток человека. Клетки эндотелия EA.hy926 и МСК выращивали в чашках Петри без смены среды в течение 9 сут. В ходе опыта производили периодический отбор образцов культуральных жидкостей. Иммуноферментные системы 4Е4-4С9 и 5F1-2С8 регистрировали увеличение концентрации растворимой формы эндоглина в ростовых средах. Скорость накопления антигена была существенно

выше у клеток эндотелия, чем у МСК (**рис. 14**). Параллельно с этим экспериментом проводили оценку жизнеспособности клеток на разных сроках инкубации без замены ростовой среды. Показано, что в течение всего эксперимента доля жизнеспособных клеток не изменялась и превышала 90-95%.

Молекулы растворимого эндоглина, находившиеся в культуральной среде клеток эндотелия EA.hy926, были очищены посредством метода иммунопреципитации с использованием МКАТ 2С8. Их анализ провели с помощью метода вестерн-блота с применением реагента 2Е1. Выделенные из ростовой среды молекулы растворимого эндоглина, как и антиген из плазмы крови здорового донора, мигрировали в геле в виде нескольких полос, однако соотношения фракций эндоглина в двух образцах существенно различались (**рис. 15**).

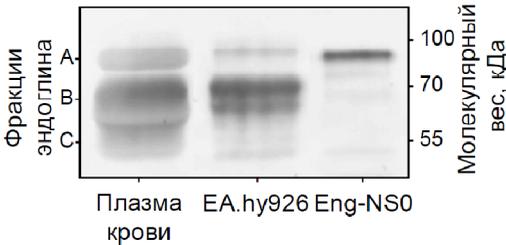


Рис. 15. Исследование молекул эндоглина, выделенных из плазмы крови здорового донора или культуральной среды клеток эндотелия человека EA.hy926 (по 200 нг), с помощью метода вестерн-блота. На последнюю дорожку нанесен рекомбинантный белок Eng-NS0 (100 нг).

Интересно, что отличия в уровнях экспрессии эндоглина между двумя культурами МСК (медианы интенсивностей флуоресценции МСК-6 и МСК-16, меченных с помощью МКАТ 2С8, составляют 1840 и 750, соответственно) не оказывают влияния на динамику обновления рецепторов, но, по всей видимости, обуславливают разные скорости накопления растворимой формы антигена в ростовой среде клеточных культур. Напротив, клетки эндотелия EA.hy926 и МСК-6, обладающие сопоставимыми уровнями экспрессии CD105, демонстрируют различные динамики обновления молекул эндоглина на мембране и скорости сброса рецептора со своей поверхности в среду (**рис. 12, 13 и 14**).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получение и характеристика молекул антигена является одним из ключевых этапов в процессе создания клеток-продуцентов МКАТ с помощью гибридной

технологии. В настоящей работе в качестве иммуногенов были использованы рекомбинантные белки, синтезированные в клетках бактерий или млекопитающих. Несмотря на отличия в гликозилировании и фолдинге, рекомбинантные молекулы стимулировали интенсивную продукцию антител у иммунизированных мышей F1(SJL/J×BALB/c). Однако мембранную форму антигена распознавали антитела только тех животных, которым вводили антиген, полученный в клетках млекопитающих (**рис. 1**). Эти данные указывают на существенный вклад вторичных модификаций полипептидной цепи в формирование структуры эпитопов нативных мембранных молекул эндоглина.

В работе создано 12 штаммов гибридом. Синтезируемые ими МКАТ взаимодействуют с рекомбинантными белками Eng-C и Eng-NS0, но только 10 из них способны связываться с молекулами CD105 на мембране клеток. Эти различия в свойствах реагентов связаны со вторичной структурой распознаваемых ими детерминант. Два МКАТ, не связывающих эндоглин на клетках, специфичны к линейным детерминантам, а остальные десять реагентов направлены к эпитопам, структура которых зависит от конформации молекул антигена (**рис. 2**). Большинство МКАТ к эндоглину, полученных другими исследователями, направлены против эпитопов, которые обладали схожими свойствами.

Детерминанты, распознаваемые созданными МКАТ, неравномерно распределены на молекуле антигена. Эпитопы, связываемые семью реагентами, имеют частичные перекрытия друг с другом, а детерминанты, распознаваемые пятью другими МКАТ, пространственно изолированы от всех остальных (**рис. 3**). Eng-ft включает 45% аминокислотной последовательности экстраклеточного домена и содержит высоко иммуногенный для мышей BALB/c эпитоп Tyr277-Gly331 (Pichuantes et al., 1997). Однако на воспроизводимый этим антигеном участок эндоглина приходится только одна из двенадцати детерминант, распознаваемых МКАТ. Эти результаты подтверждают тезис о своеобразии эпитопных специфичностей иммунного ответа животных F1(SJL/J×BALB/c) (Климович и др., 1999).

Полученные МКАТ к эндоглину человека могут быть использованы в качестве специфичных реагентов в различных методах исследования. Антитела 2E1 и 4B7,

направленные к линейным эпитомам антигена, позволяют выявлять эндоглин с помощью методов вестерн-блота (рис. 4) и иммуногистохимии (рис. 5). МКАТ к конформационным эпитомам детектируют антиген на поверхности клеток (рис. 6, 7 и 8). С помощью метода иммунофлуоресценции показана мембранная локализация антигена, распознаваемого созданными МКАТ (рис. 8).

На основе полученных МКАТ разработана серия двухцентровых систем ИФА для выявления молекул эндоглина в биологических жидкостях. Различные пары МКАТ выявляют разное содержание эндоглина в одних и тех же образцах (рис. 9). Концентрации антигена, определенные с помощью созданных двухцентровых систем, были существенно выше значений, получаемых посредством широко используемого коммерческого набора. С помощью метода вестерн-блота показана гетерогенность молекул эндоглина, выделенных из плазмы крови. МКАТ 2Е1 выявили четыре фракции белка с молекулярными весами от 62 до 90 кДа (рис. 10). Анализ данных литературы показал, что полоса белка с наибольшей массой (90 кДа), по всей видимости, состоит из полноразмерных молекул эндоглина. Их источником могут служить CD105⁺ микрочастицы эндотелия. Вторая фракция (А) наиболее вероятно соответствует фрагментам эндоглина, которые представляют собой экстраклеточный участок молекулы. Пептиды с аналогичной массой были выделены из ростовой среды клеток эндотелия другими исследователями (Hawinkels et al., 2010). Ранее было показано наличие в сыворотке крови беременных женщин фрагментов эндоглина с молекулярным весом 65 кДа (Venkatesha et al., 2006). По всей видимости, аналогичные фрагменты антигена находятся во фракции В, описанной в настоящем исследовании. Указаний на существование молекул растворимого эндоглина с массой 62 кДа в литературе не обнаружено.

Эти результаты позволили выдвинуть предположение о том, что гетерогенность молекул растворимого эндоглина является причиной различий в оценках его концентрации с помощью разных систем ИФА. Различные пары МКАТ выявляют разные фракции общего пула молекул эндоглина. Несмотря на это, все исследованные пары реагентов детектировали повышение концентрации эндоглина в плазме крови у беременных женщин по сравнению со здоровыми волонтерами и избыточную

продукцию антигена при преэклампсии (**рис. 11**).

Полученные реагенты позволяют проводить разностороннее изучение роли эндоглина в биологии клеток. Они могут быть использованы для выявления изменений в уровнях экспрессии эндоглина (**рис. 12**), изучения процесса их обновления на мембранах клеток (**рис. 13**) и определения локализации (**рис. 8**). Созданные двухцентровые системы ИФА, благодаря высокой чувствительности к антигену, позволяют отслеживать динамику накопления растворимой формы эндоглина в ростовых средах клеточных культур (**рис. 14**). Полученные реагенты также делают возможным иммуноаффинное выделение растворимого эндоглина и анализ очищенных молекул с помощью метода вестерн-блота (**рис. 15**).

ВЫВОДЫ

1. Рекомбинантные молекулы эндоглина, синтезированные в клетках бактерий или млекопитающих, обладают высокой иммуногенностью для мышей F1(SJL/J×BALB/c). Продукцию антител, взаимодействующих с мембранной формой антигена, индуцируют только пептиды, полученные в клетках млекопитающих.
2. На основе иммунных спленоцитов мышей F1(SJL/J×BALB/c) создано 12 штаммов гибридом-продуцентов моноклональных антител к эндоглину человека.
3. Полученные моноклональные антитела распознают десять конформационных и два линейных эпитопа эндоглина человека. На молекуле антигена пять реагентов распознают пространственно изолированные детерминанты, а семь антител связывают частично перекрывающиеся эпитопы.
4. Двухцентровые системы иммуноферментного анализа, основанные на различных сочетаниях иммобилизованных и меченных ферментом моноклональных антител, выявляют разные концентрации растворимого эндоглина. Система на основе реагентов 4E4 и 4C9 способна определять уровни антигена, которые в среднем на два порядка превышают значения, полученные с помощью аналогичного коммерческого набора.
5. Созданная панель моноклональных антител обеспечивает в фундаментальных и

прикладных исследованиях иммуноаффинное выделение молекул растворимого эндоглина, их детекцию методом вестерн-блота и двухцентрового иммуноанализа, а также выявление CD105 на мембранах клеток с помощью методов проточной цитофлуориметрии, иммунофлуоресценции и иммуногистохимии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК МОН России

1. **Смирнов И.В.**, Грязева И.В., Самойлович М.П., Терехина Л.А., Пиневиц А.А., Крылова А.А., Крутецкая И.Ю., Никольский Н.Н., Климович В.Б. Панель моноклональных антител против эндоглина человека: получение и характеристика, Цитология. 2015, 57(7): 499–508.
2. **Смирнов И.В.**, Грязева И.В., Самойлович М.П., Климович В.Б. Эндоглин (CD105) – мишень визуализации и анти-ангиогенной терапии злокачественных опухолей, Вопросы онкологии. 2015, 61(6): 898–907.
3. **Smirnov I.V.**, Gryazeva I.V., Samoylovich M.P., Terekhina L.A., Pinevich A.A., Shaskova O.A., Krutetskaia I.Yu., Sokolov D.I., Selkov S.A., Nikolskiy N.N., Klimovich V.B. Different pairs of monoclonal antibodies detect variable amounts of soluble endoglin in human blood plasma, *Immunochemistry & Immunopathology*. 2016, 2(121). doi: 10.4172/2469-9756.1000121

Список тезисов:

1. **Смирнов И.В.**, Самойлович М.П., Грязева И.В., Климович В.Б., Никольский Н.Н. Получение моноклональных антител к эндоглину (CD105) и перспективы их применения/ Сборник тезисов конференции «Биотехнология и качество жизни». NewYork: Nova Science Publisher, Inc., 2014: Международная научно-практическая конференция «Биотехнология и качество жизни-2014», Москва 18-20 марта 2014.
2. Климович В.Б., Самойлович М.П., **Смирнов И.В.** Взаимодействие опухолевых клеток с элементами микроокружения как фактор резистентности новообразований к терапии/ Тезисы 10-й конференции по фундаментальной онкологии. СПб.: СЗПД-Принт, 2014: Петровские чтения – 2014, Санкт-Петербург, 25 апреля 2014.
3. **Смирнов И.В.**, Грязева И.В., Самойлович М.П., Терехина Л.А., Пиневиц А.А., Крылова А.А., Крутецкая И.Ю., Климович В.Б., Никольский Н.Н. Получение и иммунохимическая характеристика моноклональных антител (МКАТ) к эндоглину/ Медицинская иммунология. Материалы XV Всероссийского научного Форума с международным участием им. акад. В.И. Иоффе. СПб.: Человек, 2015: XV Всероссийский научный форум с между-

народным участием им. академика В.И. Йоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», Санкт-Петербург, 1-4 июня 2015.

4. **Смирнов И.В.**, Грязева. И.В., Самойлович М.П., Терехина Л.А., Крутецкая И.Ю., Шашкова О.А., Климович В.Б. Различные пары моноклональных антител выявляют разное содержание растворимого эндоглина в плазме крови человека/ Медицинский академический журнал. 2016, 16(3).
5. Pinevich A.A., Terechina L.A., Vartanyan N.L., Smirnov I.V., Samoilovich M.P. Adipose derived stem cells from subcutaneous and visceral fat tissue/ Recent Achievements in Stem Cells Research (СТЕРР 2016). Abstracts, 6-8 April 2016.

Заявки на изобретения:

1. Штамм гибридных культивируемых клеток животных *Mus musculus* L. ЭН-4Е4 - продуцент моноклональных антител против эндоглина (CD105) человека; заявители Климович В.Б., Самойлович М.П., Грязева И.В., Смирнов И.В., Пиневиц А.А., Терехина Л.А., Крутецкая И.Ю., Вартанян Н.Л., Крылова А.А., Мамай И.Н. – №2604192, заявл. 20.10.2015, опубл. 10.12.2016.
2. Штамм гибридных культивируемых клеток животных *Mus musculus* L. ЭН-4С9 - продуцент моноклональных антител против эндоглина (CD105) человека; заявка 2015145138 Рос. Федерация; заявители Климович В.Б., Самойлович М.П., Грязева И.В., Смирнов И.В., Пиневиц А.А., Терехина Л.А., Крутецкая И.Ю., Вартанян Н.Л., Крылова А.А., Мамай И.Н.; заявл. 20.10.2015, приоритетная справка №2015145138 от 20.10.2015, положительное решение.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Киселева и др., 2016. Цитология. 58 (5): 349-355. – **Климович и др., 1999.** Мед иммунол 1(1-2): 47-58. – **Пиневиц и др., 2014.** Клеточные технологии в биологии и медицине, 2: 84-91. – **Cui et al., 2008.** Chin Med J (Engl), 121(2). 128-132. – **Edgell et al., 1983.** Proc Natl Acad Sci U S A, 80(12). 3734-3737. – **Gougos, Letarte, 1988.** J Immunol, 141(6). 1925-1933. – **Hawinkels et al., 2010.** Cancer Res, 70(10). 4141-4150. – **Korpanty et al., 2007.** Clin Cancer Res, 13(1). 323-330. – **Li et al., 1999.** Science, 284(5419). 1534-1537. – **Liu et al., 2002.** Oncogene, 21(54). 8272-8281. – **Muñoz R et al., 2007.** Cancer Lett, 256(1). 73-80. – **Oxmann et al., 2008.** Oncogene, 27(25). 3567-3575. – **Pichuantes et al., 1997.** Tissue Antigens, 50(3). 265-276. – **Romero et al., 2008.** J Matern Fetal Neonatal Med, 21(1). 9-23. – **Rosen et al., 2012.** Clin Cancer Res, 18(17). 4820-4829. – **Seon et al., 1997.** Clin Cancer Res, 3(7). 1031-1044. – **Takahashi et al., 2001.** Clin Cancer Res, 7(3). 524-532. – **Tian et al., 2010.** Biochem Biophys Res Commun, 392(3). 283-288. – **Tsujie et al., 2006.** Int J Cancer, 122(10). 2266-2273. – **Valluru et al., 2011.** Front Physiol, 2(89). – **Venkatesha et al., 2006.** Nat Med, 12(6). 642-649. – **Zhu et al., 2003.** Stroke, 34(10). 2483-2488.