

На правах рукописи

ЛЫЖКО НАТАЛЬЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**КЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА
ОНКОБЕЛКА PRAME**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор **Стилиди Иван Сократович**).

Научные руководители:

доктор биологических наук

Мисюрин Андрей Витальевич

Официальные оппоненты:

Балдуева Ирина Александровна, доктор медицинских наук, доцент, заведующая научным отделом онкоиммунологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Голенков Анатолий Константинович, доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения клинической гематологии и иммунотерапии государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М. Ф. Владимирского».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «16» мая 2019 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24. и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «.....» 2019 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень ее разработанности

PRAME/MAPE/OIP4 является нетипичным раково-тестикулярным антигеном, экспрессия которого ассоциирована с лейкозами и большой долей солидных опухолей (Wadelinetal.2013). Ограниченный характер экспрессии гена *PRAME* в нормальных тканях и сильная экспрессия в опухолях представляют его как полезный маркер минимальной остаточной болезни после химиотерапии и привлекательную мишень для иммунотерапии, в частности, при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) и хроническом миелоидном лейкозе (ХМЛ)(Atanackovic et al 2011, Ikeda et al.1997, Kessler et al.2001, Matsushita et al.2001, Tajeddine et al. 2006). В связи с открывшейся возможностью использования белка *PRAME* для терапии онкологических заболеваний, немаловажное значение получил вопрос об его локализации в опухолевой клетке. Согласно данным литературы (Tajeddineetal.2005) белок *PRAME* был обнаружен как в ядре, так и цитоплазме клеток (CHO-K1 и HeLa, клетках рака яичников) и строме опухоли (Partheenetal. 2008). Однако более точной информации о расположении белка *PRAME* в опухолевой клетке получено не было. Поэтому одной из задач данной работы было изучить локализацию белка *PRAME* в опухолевой клетке.

Несмотря на то, что раково-тестикулярные антигены, в том числе и ген *PRAME*, сейчас подвергаются активному изучению, наши знания об их функциях в клетке, являются далеко не полными. Для изучения функции белка *PRAME* было проведено сравнение профилей экспрессии ряда генов в культуре клеток нормальных фибробластов человека WI-38 и трансфицированной линии WI-38 *PRAME*, в которой ген *PRAME* экспрессировался под контролем CMV-промотора.

Дендритные клетки (ДК) являются главными антигенпрезентирующими специализированными лейкоцитами, представляющими антигены покоящимся, наивным и Т-клеткам памяти, играют важную роль в индукции как клеточного, так и гуморального ответа *in vivo*, также они играют ключевую роль в поддержании иммунной толерантности. В ряде работ было показано, что ДК непосредственно оказывают цитотоксическое действие на опухолевые клетки, помимо их способности представлять опухолевые антигены Т- и В-лимфоцитам (Charovaletal. 2000, Panetal. 2010). При разработке дендритно-клеточных вакцин с целью повышения их цитотоксического действия для нагрузки ДК часто используют различные антигены (как лизаты, полученные из клеток опухоли, так и очищенные от примесей белки – опухолевые антигены). Одна из задач в работе заключалась в том, чтобы определить, как нагрузка ДК белком *PRAME* повлияет на проявление ими цитотоксического действия в отношении опухолевых клеток.

Цель исследования

Изучить клеточную локализацию и функциональные свойства онкобелка PRAME с использованием культур нормальных и опухолевых клеток *in vitro*.

Задачи исследования

1. Определить локализацию белка PRAME в опухолевых клетках.
2. Исследовать воздействие моноклональных антител к белку PRAME на опухолевые линии клеток.
3. Изучить влияние экспрессии гена *PRAME* на транскрипционный профиль фибробластов человека WI-38.
4. Исследовать влияние белка PRAME на цитотоксическое действие дендритных клеток при их совместной инкубации с опухолевыми клетками.

Научная новизна исследования

Эпитопы белка PRAME впервые обнаружены как внутриклеточно, так и на поверхности опухолевой клетки у больных острыми лейкозами. Обнаружено цитостатическое действие МКА к белку PRAME на опухолевые клетки. Кроме того, впервые показано влияние гена *PRAME* на уровень экспрессии ряда генов (*MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A12, TNFAIP8, BNIP1, RIPK1, G1P3, SP110, MAD2L1, EMP2, IRF9, STAT1RAB2, BOP1, ACTINB, PLAB, PCTK1, TNFAIP2, TNRC6*) на модели линии WI-38, которая экспрессирует белок PRAME. При нагрузке ДК белком PRAME впервые обнаружено усиление их цитотоксического действия в отношении опухолевых клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы

Обнаружение эпитопов белка PRAME на поверхности опухолевой клетки позволяет использовать этот антиген в качестве мишени для иммунотерапии опухолей. Полученный эффект цитостатического действия антител к белку PRAME на PRAME-экспрессирующие опухолевые клетки позволяет использовать МКА к белку PRAME в качестве основы для разработки противоопухолевого лекарственного средства. Рекомбинантный антиген *PRAME* может быть использован для нагрузки дендритных клеток при разработке противоопухолевых дендритно-клеточных вакцин. Моноклональные антитела против PRAME могут использоваться для диагностики злокачественных опухолевых заболеваний, а также для изучения механизмов канцерогенеза.

Методология и методы исследования

Локализацию белка PRAME в опухолевых клетках определяли с помощью МКА к белку PRAME путем иммуногистохимического окрашивания клеток. Цитотоксическое действие МКА

на опухолевые клетки оценивали с помощью МТТ-теста и подсчетом клеток с помощью камеры Горяева. Для определения изменений в уровне экспрессии генов при трансфекции в клетку гена *PRAME* был использован метод ДНК микрочипов. Методика получения ДК была взята из работы Чкадуа Г.З. и соавт. 2002 с некоторыми изменениями. Определение уровня экспрессии гена *PRAME* в опухолевых клетках проводилось с помощью метода ПЦР в реальном времени.

Личный вклад автора

В работе над диссертацией автором был проведен сбор и изучение большого количества научной литературы. Автором выполнен анализ и статистическая обработка полученных данных, а также было выполнено обоснование, обобщение результатов экспериментов и оформление диссертации.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – «онкология», конкретно пункту 2.

Положения, выносимые на защиту

1. Белок *PRAME* локализуется на поверхности опухолевой клетки и внутриклеточно (в ядре и цитоплазме).
2. Моноклональные антитела к белку *PRAME* оказывают цитостатическое действие на пролиферацию клеток, экспрессирующих белок *PRAME*.
3. При активации в клетке гена *PRAME* происходит увеличение уровня экспрессии группы генов (*MAGE-A3*, *MAGE-A6*, *MAGE-A12*, *BNIP1*, *RIPK1*, *G1P3*, *SP110*, *MAD2L1*, *EMP2*, *IRF9*, *STAT1*, *RAB2*, *BOP1*, *ACTINB*) которые направлены на прогрессию опухоли и подавление экспрессии ряда генов, сдерживающих опухолевый рост (*PLAB*, *PCTK1*, *TNFAIP2*, *TNRC6*).
4. Нагрузка зрелых ДК белком *PRAME* позволяет сохранить и в некоторых случаях, усилить их цитотоксическое действие на опухолевые линии клеток (K562, ТНР-1, NОМО-1, U-937).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Степень достоверности результатов

При выполнении данной работы использовалось сертифицированное оборудование. Полученные результаты, которые были проанализированы методами статистической обработки

данных, оказались воспроизводимы. Это дает основания считать полученные данные достоверными.

Апробация диссертационной работы

Диссертационная работа была апробирована 04 июля 2018 г. на совместной научной конференции лаборатории фармакологии и токсикологии, лаборатории экспериментальной диагностики и терапии опухолей, лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза, лаборатории клеточного иммунитета, лаборатории трансгенных препаратов, лаборатории иммунофармакологии, лаборатории медицинской биотехнологии НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Материалы диссертационной работы были представлены на XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова, Москва, 2016 г. и на XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова, Москва, 2017 г.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, главы материалы и методы исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов и списка литературы. Диссертация представлена на 117 страницах машинописного текста, текст содержит 17 рисунков и 4 таблицы. Список литературы состоит из 244 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Клеточные линии. Эксперименты проводились на следующих линиях клеток: эритромиелоидный лейкоз K562, промиелоцитарный лейкоз ТНР-1, моноцитарный лейкоз НОМО-1, мышьяная меланома В16F10, нормальные фибробласты человека WI-38, лимфома U937.

Исследованные больные. В процессе работы были взяты образцы крови и костного мозга больных, которые имели острые и хронические формы гематологических новообразований. Среди них были обнаружены больные с диагнозом: острый миеломоноцитарный лейкоз(10), острый промиелоцитарный лейкоз(10), острый миелоидный лейкоз(6), острый В-лимфобластный лейкоз(5), острый мегакариобластный лейкоз(3), острый билинейный лейкоз(1), хронический миелоидный лейкоз(5).

Общее количество больных было равно 40, при этом у небольшого процента больных материал для исследования удалось получить как в дебюте заболевания, так и после достижения ими стадии ремиссии или при проведении мониторинга болезни.

Материал из контрольной группы (образцы крови) были отобраны у 2 здоровых доноров.

Культуральный метод

Культивирование клеточных линий проводили с использованием стандартных сред (RPMI-1640, DMEM, (MPBiomedicals, Франция)) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (CELLectCold, MPBiomedicals, Франция), антибиотика (гентамицина сульфата 40 мг/мл раствор, KRKA, Словения) и 0,01% раствора глутамин. Прикрепленные культуры клеток пересеивали с использованием растворов версена и трипсина (ПанЭко, Россия). Культивирование клеточных линий проводили в CO₂ инкубаторе при температуре +37°C и содержании углекислого газа не более 5%.

Трансфекция линий плазмидой, содержащей ген PRAME

Постановку реакции трансфекции клеток фибробластов человека WI38 и клетках мышинной меланомы B16F10 с плазмидами p-CEP4 и p-CEP4 PRAME проводили согласно инструкции (TransFastTransfectionReagent, Promega и MetafectenePro, Biontex). Через 48 часов после постановки реакции к клеткам добавляли селективный антибиотик гигромицин В (Sigma). После трансфекции в клетках WI-38, B16F10pCEP4 PRAME определили с помощью метода RealTimePCR экспрессию гена *PRAME*.

Выделение лимфоцитов (ЛФ) на среде Lymphoseparation medium по градиенту плотности из КМ

Выделение фракции мононуклеарных клеток из крови проводили согласно инструкции производителя (MPBiomedicals, США-Франция). Перед постановкой эксперимента выделенные мононуклеары инкубировали в течение 12-24 ч при температуре +37°C содержании углекислого газа не более 5%.

Приготовление препаратов из клеток костного мозга для иммуногистохимического окрашивания

Приготовление фиксированных препаратов на предметном стекле (без полилизина)

Была разработана методика иммуногистохимического окрашивания фиксированных клеток как из клеточных культур, так из материала от больных на предметных стеклах (MPBiomedicals, США-Франция). В работе были использованы моноклональные антитела (МКА) к белку PRAME (5D3F2, 6H8F12, разведение 1:100), раствор флуоресцентных

антител(488 goatantimouseAlexaFlourIgG(H+L) Invitrogen), раствор Хехста (Hoechst 33342, Invitrogen), фосфатно-солевой буфер (PBS), (MPBiomedicals, Франция). Оценку уровня и интенсивности флуоресцентного сигнала в клетках производили с помощью инвертированного микроскопа Axiovert40 и программы AxioCamHRRev.3 (CarlZeiss).

Работа с живыми клетками в лунках с полилизинном на предметных стеклах

Работу с живыми клетками в лунках с полилизинном выполняли согласно авторской методике (Булычева Т.И) с некоторыми модификациями. В частности, была разработана методика приготовления фиксированных препаратов из КМв лунках с полилизинном на предметном стекле.

МТТ тест

Постановку эксперимента проводили согласно методике (Mossmantetal.1983). В работе были использованы следующие реактивы: МТТ(3-(4,5-диметрилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид) (ПанЭко, Россия), диметилсульфоксид (Amresco, США).

Метод анализа ДНК микрочипов

Выделение РНК из суспензии клеток проводилось с **помощью** реагента TRIzol (Invitrogen) согласно инструкции производителя. Синтез из РНК кДНК (кДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота, полученная из рибонуклеиновой кислоты с помощью реакции обратной транскрипции) проводился с помощью реакции обратной транскрипции с использованием набора случайных нуклеотидных гексамеров в качестве праймеров и обратной транскриптазы М-MLV (Fermentas, США). Полученную кДНК метили с помощью флуорохромных красителей (Су3илиСу5), а затем очищали с использованием модуля очистки системы маркировки Invitrogen. Гибридизацию проб проводили согласно методике (C.Butler et al. 2015 г). Анализ изображения выполнялся с использованием программного обеспечения GenePixPro 6.0(MolecularDevices).

Получение дендритных клеток

Методика получения ДК взята из работы Чкадуа и соавт.2002 г. с некоторыми модификациями. В работе использовались антитела фирмы «BeckmanCoulter» (Франция), цитокины :интерлейкин-2 (ИЛ-2; 10 ед/мл; Sigma, США), интерлейкин-4 (ИЛ-4; Sigma), фактор некроза опухоли α (ФНО $-\alpha$, Sigma) и простагландин E2. Зрелость дендритных клеток определяли в реакции иммунофлуоресценции методом двойного окрашивания. Экспрессию антигенов на клеточной поверхности оценивали на проточном цитофлуориметре

BDFACSCantoII (США). Анализируемый гейт устанавливали на основании комбинации светорассеивания и размера клеток.

«Нагрузка» ДК

ДК «нагружали» либо лизатом (Asavaroengchai et al. 2002) клеток K562, либо белком PRAME. Соотношение ДК к клеткам K562 1: 3. ДК инкубировали с антигеном 1 сутки.

Терминальная дифференцировка ДК

Клетки после «нагрузки» отмывали от среды и помещали в среду с фактором некроза опухоли – α (ФНО- α , Sigma) и простагландином E2 (ПГЕ2; Sigma) на 2 дня.

Совместная инкубация ДК с опухолевыми или нормальными клетками

После окончания инкубации со всеми цитокинами, ДК культивировали отдельно или в смеси с клетками линий K562, U937, NОМО- 1, ТНР-1 или с нормальными фибробластами WI-38. За сутки до окончания инкубации в лунки добавляли по 1 мкКи (40 кБк) [3Н]-тимидина, затем определяли включение [3Н]- тимидина. В лунках без [3Н]- тимидина подсчитывали число клеток, окрашенных трипановым синим.

Выделение РНК и ПЦР в реальном времени

Выделение РНК выполнили гуанидинтиоционат хлороформ-фенольным методом из суспензий клеточных культур, а также из клеток костного мозга и периферической крови больных острыми лейкозами (Chomczynski, Anal. Biochem. 1987). Реакция обратной транскрипции была поставлена с использованием набора случайных нуклеотидных гексамеров в качестве праймеров и обратной транскриптазы M-MLV (Fermentas, США). Количественный метод определения экспрессии гена PRAME в культурах клеток, а также клетках костного мозга больных острыми лейкозами, проводили с помощью RealTimePCR по технологии TaqMan с применением специфических праймеров и флуоресцентных зондов на приборе IQ Cycler (BioRad, США). С помощью одноканального секвенатора ABI Prizm 310 определили специфичность прошедшей реакции PCR (Applied Biosystems, США) (Smith et al. 2009).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты трансфекции линий В16F10 и WI-38 плазмидой, содержащей ген PRAME

Были получены линии клеток WI-38 и В16F10, трансфицированные плазмидным вектором, который содержит кодирующую часть гена PRAME.

Экспрессия гена *PRAME* в клетках WI-38 была определена с помощью метода RealTimePCR:

WI-38 – $8,0 \times 10^{-4}$ PRAME/Abl;

WI-38 p-CEP4 – $2,59 \times 10^{-3}$ PRAME/Abl;

WI-38 p-CEP4-PRAME – $5,42 \times 10^2$ PRAME/Abl.

Экспрессия гена *PRAME* в клетках B16F10pCEP4PRAME была определена с помощью метода RealTimePCR:

B16F10 PRAME – $3,94 \times 10^2$ PRAME/Abl.

Локализация белка PRAME

Локализация белка PRAME в опухолевых линиях

Во всех исследуемых в работе культурах клеток, а также клетках крови и костного мозга больных острыми лейкозами производили определение уровня экспрессии гена *PRAME* методом RealTimePCR. Локализация белка *PRAME* в опухолевой клетке (лейкоз, лимфома, меланома) определялась с помощью иммунофлуоресцентного анализа, при этом использовались мышиные МКА к белку *PRAME* (5D3F2 и 6H8F12) и вторичные флуоресцентные антимышиные антитела. В качестве контроля использовали химерное моноклональное антитело CD20 (ритуксимаб). В линии клеток меланомы человека melKor, которая показала высокий уровень экспрессии *PRAME* (табл. 1), обнаружили локализацию белка *PRAME* преимущественно в ядре (66,5%), в цитоплазме (28,5%) и на поверхности клеток (5%).

Таблица 1 – Определение локализации белка PRAME с помощью МКА (5D3F2, 6H8F12)

в различных линиях клеток

Клетки	Фиксация клеток	Обработка TBSTB	Антитело 5D3F2			Антитело 6H8F12			Интенсивность флуоресценции	Уровень экспрессии гена PRAME *
			Локализация, выявленная антителом в клеточных компартментах, %			Локализация, выявленная антителом в клеточных компартментах, %				
			Ядро	Цитоплазма	Внешняя мембрана	Ядро	Цитоплазма	Внешняя мембрана		
mel Kor	+	-	54	54	10	Н/Д*	Н/Д	Н/Д	++	568%
mel Kor	+	+	88	12	0	Н/Д	Н/Д	Н/Д	++	568%
mel Kor	-	-	0	0	40	Н/Д	Н/Д	Н/Д	±	568%
K562	+	-	51	49	0	0	0	100	++	541%
WI-38	+	+	0	0	0	0	0	0	-	0,0013%
WI-38- pCEP4- PRAME	+	+	80	20	0	Н/Д	Н/Д	Н/Д	++	542%
B16F10- pCEP4	+	-	0	0	0	Н/Д	Н/Д	Н/Д	-	0%
B16F10- pCEP4- PRAME	+	-	20	80	0	Н/Д	Н/Д	Н/Д	+	373%

*Уровень экспрессии гена PRAME был рассчитан в процентах относительно гена Abl. **

Н/Д – эксперимент не проводился. Фиксация клеток: «+» – клетки были фиксированы, «-» – живые клетки. Обработка TBSTB: «+» – проводилась, «-» – не проводилась. Интенсивность флуоресценции: «++» – оценивалась как очень высокая, «+» – высокая, «+-» – низкая, «-» – отсутствует.

При исследовании кинетики связывания мышинового МКА 5D3F2 (1:100) с клетками меланомы mel Кор было обнаружено, что при увеличении времени инкубации с 30 до 120 мин происходит перераспределение сигнала флуоресценции. Это обнаруживается в виде усиления внутриклеточного сигнала по сравнению с поверхностью клетки (рис. 1).

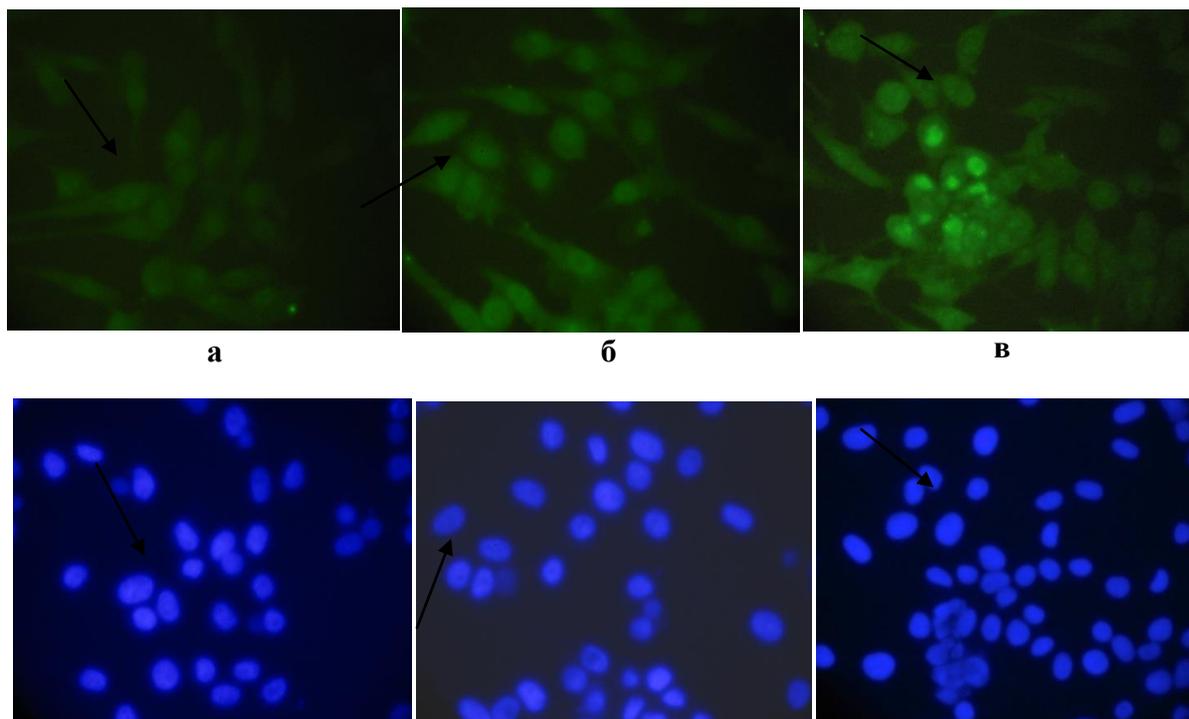


Рисунок 1 – Кинетика связывания МКА 5D3F2 к PRAME в фиксированных клетках melKor. Время инкубации клеток с МКА 5D3F2 к PRAME: 30 мин (а), 60 мин (б), 120 мин (в); (г), (д), (е) – окраска Хёхстом препаратов (а), (б) и (в), соответственно. Увеличение x100. Стрелками указано перераспределение сигнала флуоресценции с поверхности клетки (а) внутрь клетки (б), а затем и появление его в ядре (в).

В клетках эритромиелоидного лейкоза линии K562 уровень экспрессии гена PRAME был высоким (табл. 2). На фиксированных препаратах из линии K562 было обнаружено, что полученные нами 2 типа МКА 5D3F2 и 6H8F12 имеют отличные друг от друга сайты связывания в этих клетках. При использовании МКА 5D3F2 сигнал флуоресценции обнаруживался в равных долях как внутриклеточно – в ядре (51%), так и в перинуклеарном пространстве и в цитоплазме (49%). Для МКА 6H8F12 при одинаковых условиях инкубации сигнал флуоресценции был обнаружен на клеточной поверхности линии K562 (рис.2).

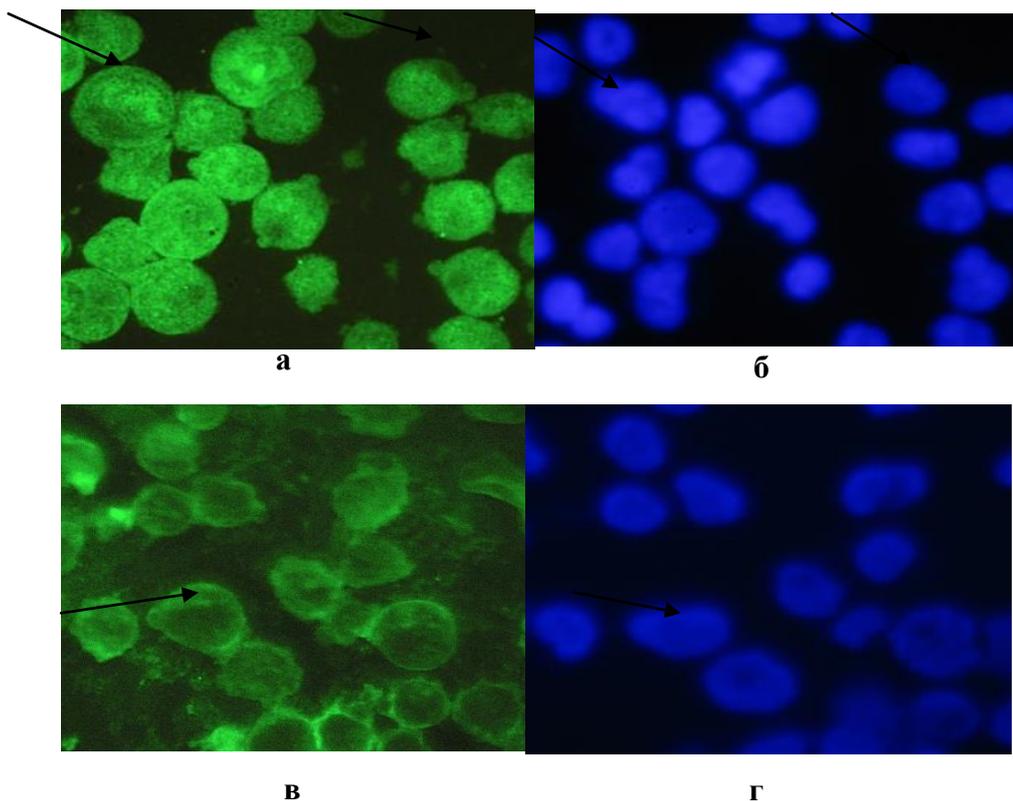


Рисунок 2 – Инкубация фиксированных клеток K562 с МКА 5D3F2 к PRAME(**а, б**) и 6H8F12 (**в, г**) в разведении 1:100; **б** и **г** – окраска препаратов Хехстом. Стрелками указано расположение эпитопов белка PRAME внутриклеточно (**а** с МКА 5D3F2) и на поверхности клетки (**в** с МКА 6H8F12). Увеличение x100.

Для того чтобы изучить локализацию белка PRAME в клетке были выбраны линии фибробластов человека WI-38 и меланомы мыши B16F10, которые не экспрессируют ген *PRAME*. В исходной линии клеток WI-38 при инкубации ее с МКА 5D3F2 к PRAME не было обнаружено никакого сигнала флуоресценции (рис.3, а). После проведенной трансфекции уровень экспрессии гена *PRAME* в клетках линии WI-38-pCER4-PRAME был сравним с уровнем, который обнаружили в клетках линий melKor и K562 (табл.2). После инкубации трансфицированных клеток WI-38-pCER4-PRAME с МКА к PRAME уровень обнаруженного флуоресцентного сигнала в этих клетках был также высок, как и в линиях с первоначально высоким уровнем экспрессии гена *PRAME*. При этом сигнал флуоресценции наблюдали в основном, внутриклеточно - в ядре клетки и в цитоплазме, что очень похоже на картину для линии клеток K562 (рис.3).

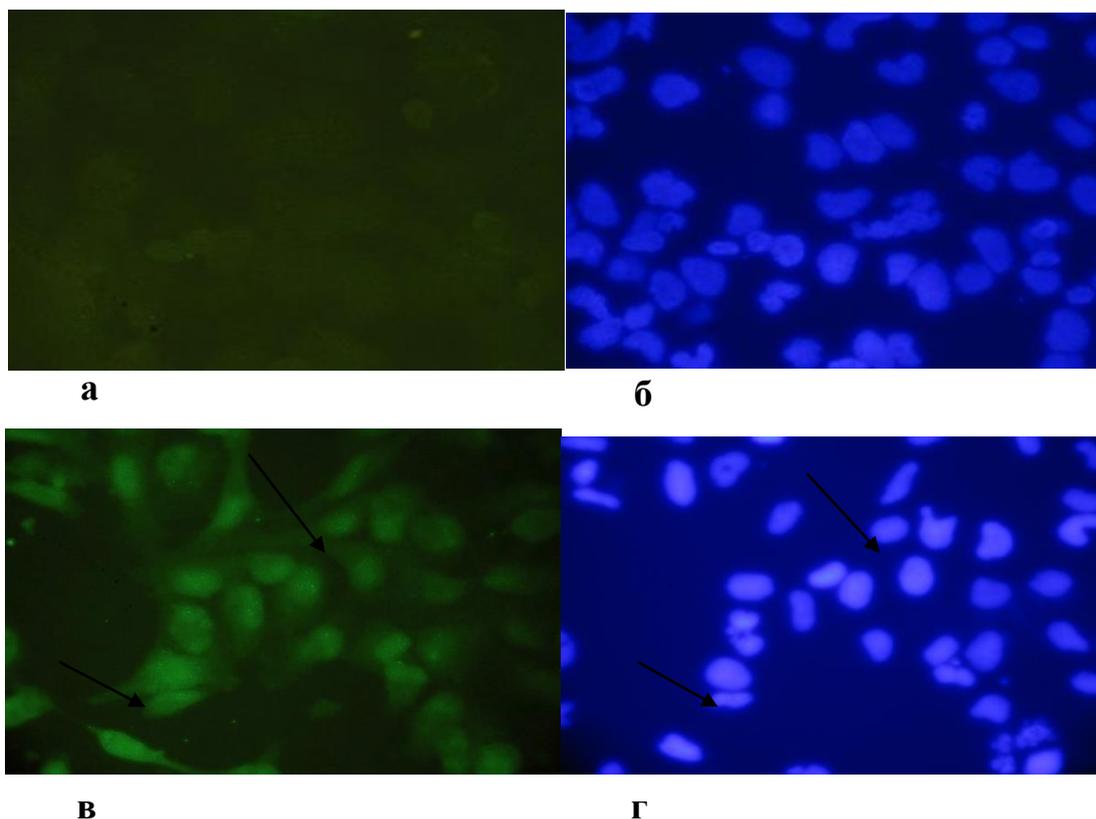
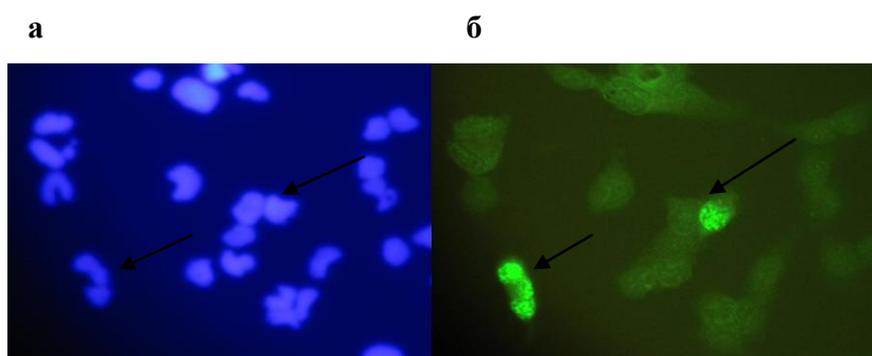


Рисунок 3 – Инкубация фиксированных клеток WI-38 с МКА5D3F2 к PRAME(1:100)(**а**, **б**) и WI-38 PRAME с МКА5D3F2 к PRAME(1:100)(**в**, **г**); **б** и **г** – окраска препаратов Хехстом.. Стрелками указано расположение эпитопов белка PRAME внутриклеточно (**в** с МКА 5D3F2) линии WI-38 PRAME. Увеличение x100.

Кроме того, для трансфицированной геном *PRAME* линии клеток WI-38 PRAME при постановке иммуногистохимической реакции была обнаружена локализация флуоресцентного сигнала в ядре клетки. Ее особенностью было образование отдельных ярко светящихся точек, которые образовывали в ядре клетки скопления – «кластеры» (см. рис. 4). Отметим, что подобные структуры в ядре клетки наблюдали и на линии клеток mel Kog, которая обладает достаточно высоким уровнем экспрессии гена *PRAME*.



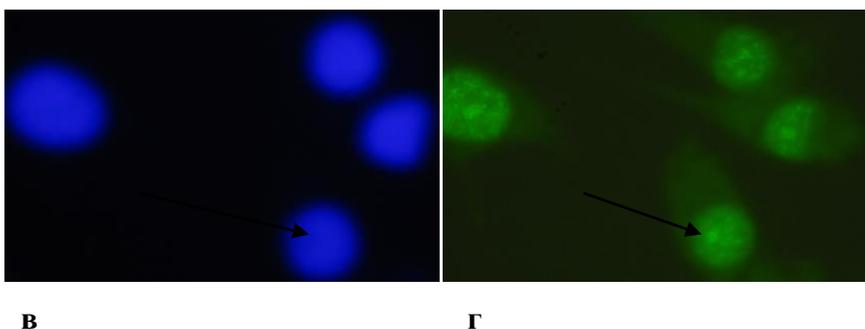


Рисунок 4 – Инкубация фиксированных клеток WI-38 PRAME с МКА 5D3F2 к PRAME(1:100) (**б**) и клеток mel Kog с МКА 5D3F2 к PRAME(1:100) (**г**); **а** и **в** – окраска препаратов Хехстом. Стрелками указана локализация эпитопов белка PRAME в ядрах клеток линии WI-38 PRAME(**б**) и линии mel Kog (**г**). Увеличение x100.

При инкубации клеток меланомы мыши B16F10, которые были трансфицированы контрольной плазмидой pSEP4, с МКА к белку PRAME сигнала флуоресценции обнаружено не было. В клетках мышинной меланомы B16F10-pSEP4-PRAME уровень экспрессии гена *PRAME* был ниже, сигнал наблюдаемой флуоресценции был слабее, количество клеток с локализацией сигнала в ядре было меньше по сравнению с линиями клеток melKog, K562 и WI-38-pSEP4-PRAME (табл.2) (рис.5).

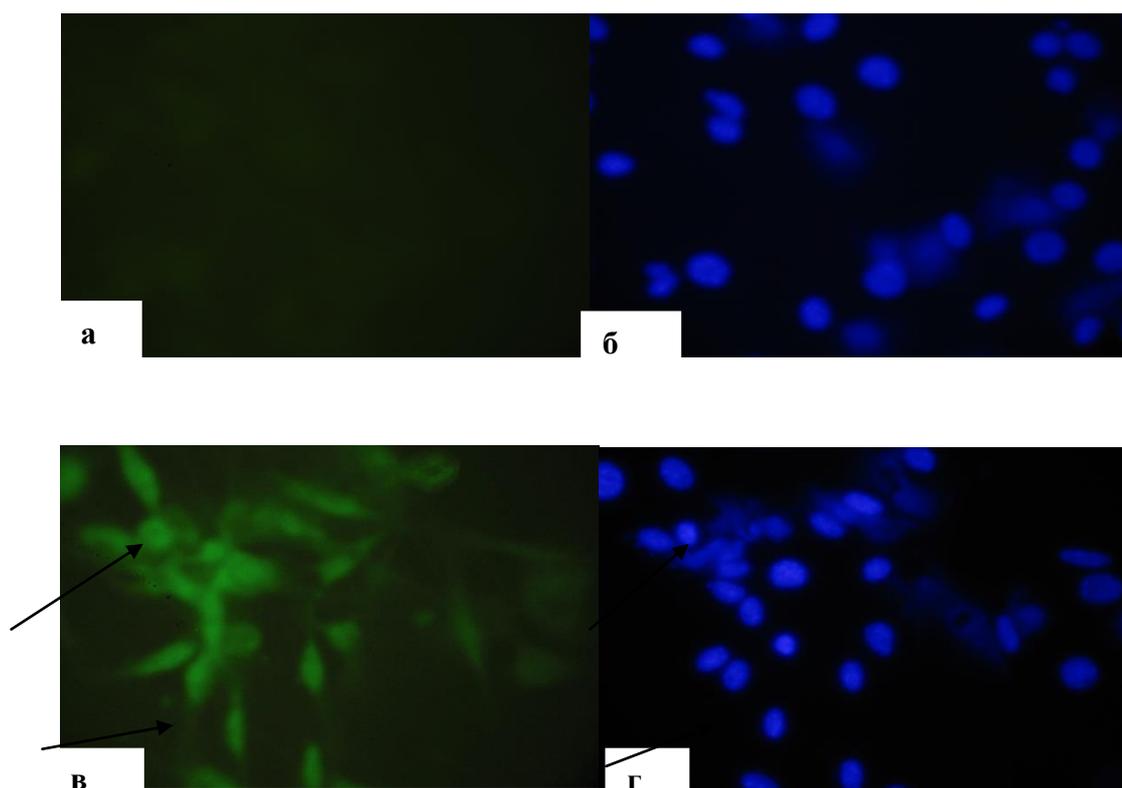


Рисунок 5 – Инкубация фиксированных клеток B16F10 с МКА 5D3F2 к PRAME(1:100)(**а**, **б**) и B16F10PRAMEс МКА 5D3F2 к PRAME (1:100) (**в**, **г**). Яркость изображения (**в**, **г**) увеличена на 20% по сравнению с оригиналом. Стрелками указана локализация эпитопов белка PRAME внутри клетки (**в** с МКА 5D3F2). Увеличение x100.

Распределение белка PRAME в клетках костного мозга больных острым лейкозом

В результате экспериментов была обнаружена зависимость расположения PRAME в клетке от уровня экспрессии гена *PRAME*. В исследованном материале от больных был оценен уровень экспрессии гена *PRAME*. В результате анализа полученных данных, все больные были разделены на две группы по уровню экспрессии гена *PRAME* (группа больных с высоким уровнем и группа с низким уровнем экспрессии PRAME). В результате иммунофлуоресцентного анализа были получены следующие данные: в группе больных с высоким уровнем экспрессии *PRAME* (0,587-6,3% PRAME/Abl) белок располагался как внутриклеточно (33,3% в ядре и 23,3% в цитоплазме), так и на клеточной поверхности (43,3%); в группе больных с низким уровнем экспрессии гена *PRAME* ($0-5,87 \times 10^{-3}$ PRAME/Abl) белок PRAME локализовался в цитоплазме (36,9%), так же он был обнаружен и на поверхности клеток (34,6%). В (28,5%) случаев белок PRAME не был обнаружен (табл. 2).

Таблица 2 – Определение локализации белка PRAME с помощью МКА 5D3F2, 6H8F12 к PRAME в клетках КМ больных

Клетки	Фиксация клеток	Обработка TBSTB	Антитело 5D3F2			Антитело 6H8F12			Интенсивность флуоресценции	Уровень экспрессии гена PRAME*
			Локализация, выявленная антителом в клеточных компартментах, %			Локализация, выявленная антителом в клеточных компартментах, %				
			Ядро	Цитоплазма	Внешняя мембрана	Ядро	Цитоплазма	Внешняя мембрана		
Клетки больного	+	-	0	29	71	0	4	96	±	1,18%
Клетки больного	+	-	100	0	0	100	0	0	+	1,75%
Клетки больного	+	-	0	40	60	0	67	33	+	3,33%
Клетки больного	+	-	0	0	0	0	0	0	-	0,0059%
Клетки больного	+	-	0	88	12	0	47	53	+	0,0037%
Клетки больного	+	-	0	34	66	0	32	68	++	0,0073%
Клетки больного	+	-	0	0	0	0	0	0	-	0%

*Уровень экспрессии гена PRAME был рассчитан в процентах относительно гена Abl.

Фиксация клеток: «+» клетки были фиксированы, «-» живые клетки. Обработка TBSTB: «+»

проводилась, «-» не проводилась. Интенсивность флуоресценции: «++» оценивалась как очень высокая, «+» высокая, «+-» низкая, «-» отсутствует.

Таким образом, с помощью использованных МКА к белку PRAME было обнаружено связывание этих антител не только внутри, но и на поверхности клеток (как в линиях опухолевых клеток, так и в КМ больных), что открывает возможность использования полученных МКА для терапии опухолей.

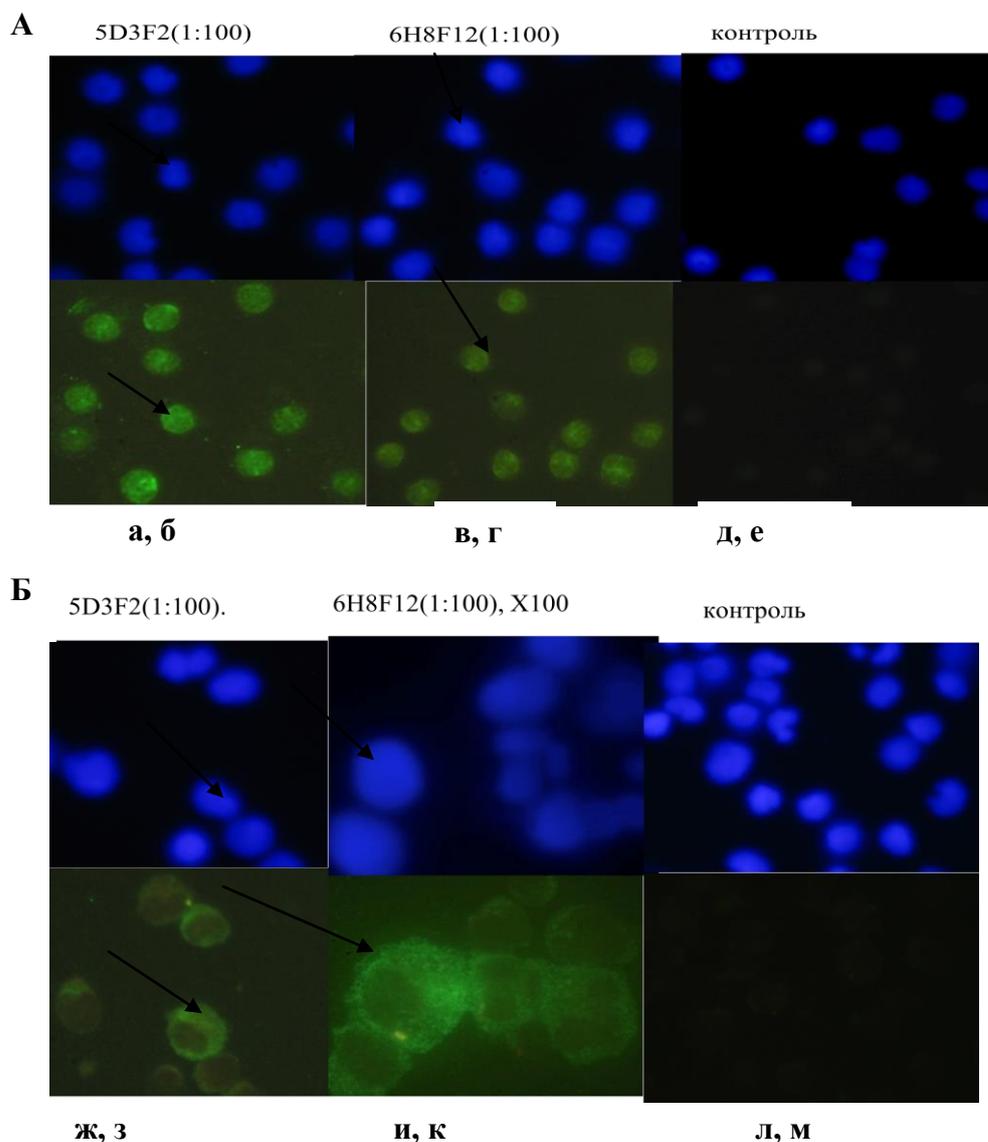


Рисунок 6 - Инкубация клеток больных острым лейкозом с относительно высоким уровнем экспрессии гена *PRAME* с МКА 5D3F2 (**б, з**) и с МКА 6H8F12 (**г, к**). Фото под номерами **а, в, д, ж, и, л** – окраска препаратов Хехстом. На фото **А** стрелками показана внутриклеточная, в основном ядерная локализация эпитопов белка *PRAME*. На фото **Б** стрелками показана внутриклеточная локализация эпитопов белка *PRAME*, в цитоплазме и частично на поверхности клетки. Увеличение x100. Яркость изображения увеличена на 20% по сравнению с оригиналом.

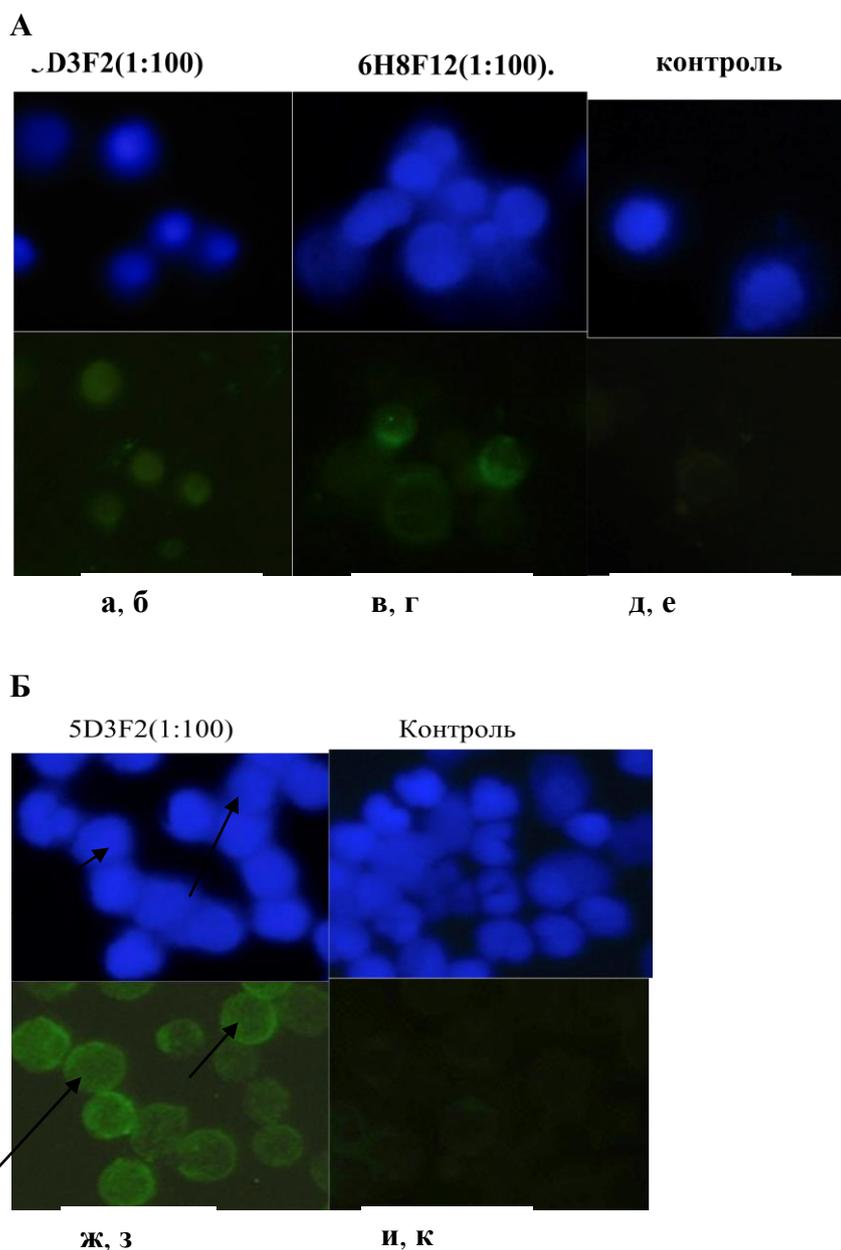


Рисунок 7 - Инкубация клеток больных острым лейкозом с относительно низким уровнем экспрессии гена *PRAME* с МКА 5D3F2 (з) (фото Б) и без экспрессии гена *PRAME* с МКА 5D3F2 (б) и 6H8F12 (г) (фото А). Фото под номерами а, в, д, ж, и – окраска препаратов Хехстом. На фото А видна незначительная автофлуоресценция. На фото Б стрелками показана локализация эпитопов белка *PRAME* на поверхности клетки. Увеличение x100. Яркость изображения увеличена на 20% по сравнению с оригиналом.

Подавление роста PRAME-экспрессирующих опухолевых клеток при инкубации их с моноклональных антителами к белку PRAME

Воздействие моноклональных антител на линию WI-38 PRAME

Согласно полученным данным, мышиные МКА можно применять для определения локализации PRAME в линии мышинной меланомы B16F10PRAME. В качестве модели для изучения действия МКА к белку PRAME на опухолевую клетку отобрали клеточную линию B16F10, которая экспрессирует PRAME. В проведенном эксперименте использовались сыворотки крови контрольных мышей и мышей, иммунизированных белком PRAME, полученным ранее (Misyurin et al 2010) и МКА 5D3F2 к PRAME. В результате проведенного эксперимента максимальный ростингибирующий эффект был обнаружен при сочетанной инкубации клеток линии B16F10-pSEP4-PRAME с МКА к белку PRAME и сывороткой крови иммунизированных мышей. Наблюдали подавление пролиферации клеток почти в 5 раз по сравнению с контролем, процент мертвых клеток в этом случае возрастал до 50%(рис.5).

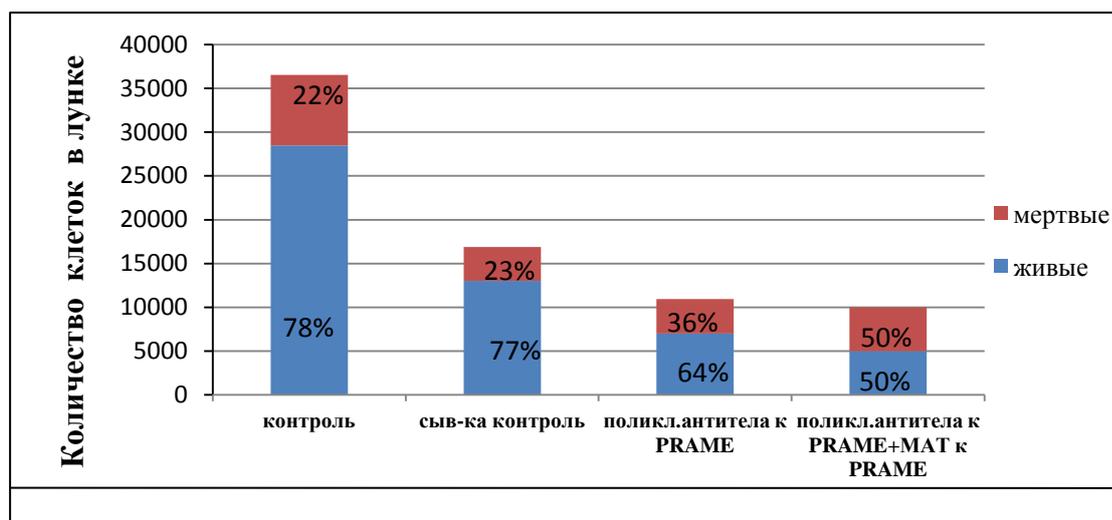


Рисунок 8 – Влияние сывороток мышей и МКА5D3F2к PRAME на рост клеток B16F10-pSEP4-PRAME

Цитостатическое действие МКА к PRAME на опухолевые клетки

Эксперимент по изучению действия МКА к белку PRAME(5D3F2 и 6H8F12) проводили на клеточных линиях K562,ТНР-1,НОМО-1,WI-38,WI-38 PRAME при их совместной инкубации.. Отбор линий для проведения эксперимента проводили на основании измерения уровня экспрессии гена PRAME в клеточных линиях (K562 – 541%,НР-1 – 44,3%, НОМО-1– 0,713%,WI-38 – 0,0013%,WI-38 PRAME–542%). Добавление моноклональных антител 5D3F2 и 6H8F12 к PRAME в выбранных концентрациях в культуральную среду приводило к замедлению роста клеток, как в первые, так и в последующие сутки. В качестве контроля

использовали химерное моноклональное антитело мыши/человека к трансмембранному антигену CD20(ритуксимаб). Измерение концентрации клеток в суспензии проводили с помощью подсчета их в камере Горяева. Для определения цитостатического действия МКА к PRAME использовали МТТ-тест.

Рассмотрим это на примере линии K562, инкубированной при разных концентрациях МКА6H8F12(рис.9).

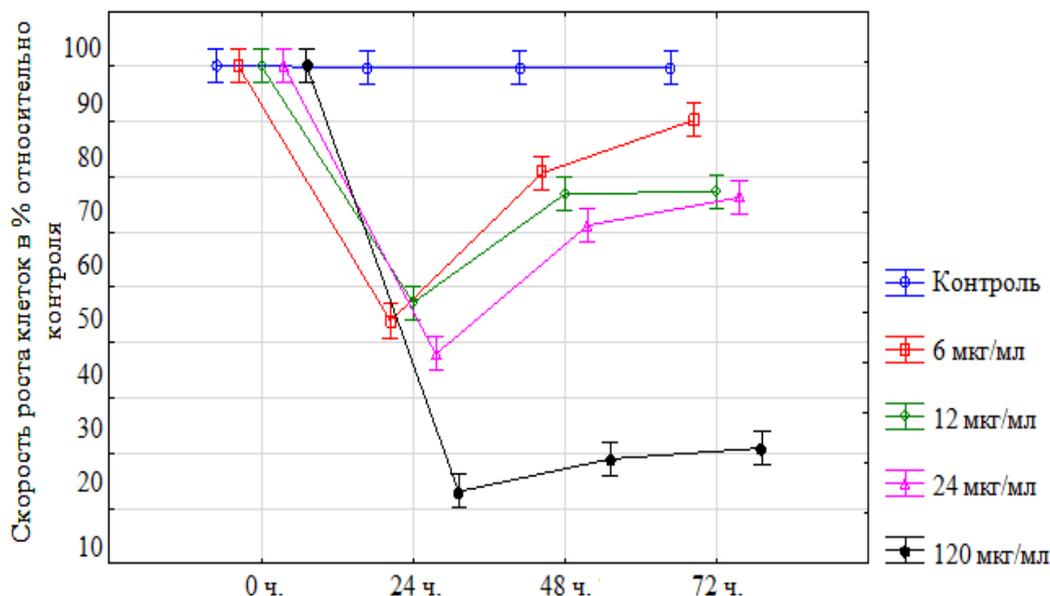


Рисунок 9 – Динамика роста линии клеток K562 в зависимости от концентрации МКА 6H8F12 к PRAME в культуральной среде

Эффект замедления роста клеток увеличивался напрямую с ростом концентрации МКА6H8F12 к PRAME в среде (коэффициент корреляции Пирсона составил 0,67; $p = 0,0219$), особенно в первые сутки инкубирования ($p < 0,0001$). Скорость роста клеток K562 снижается одинаково вне зависимости от типа МКА (рис. 10).

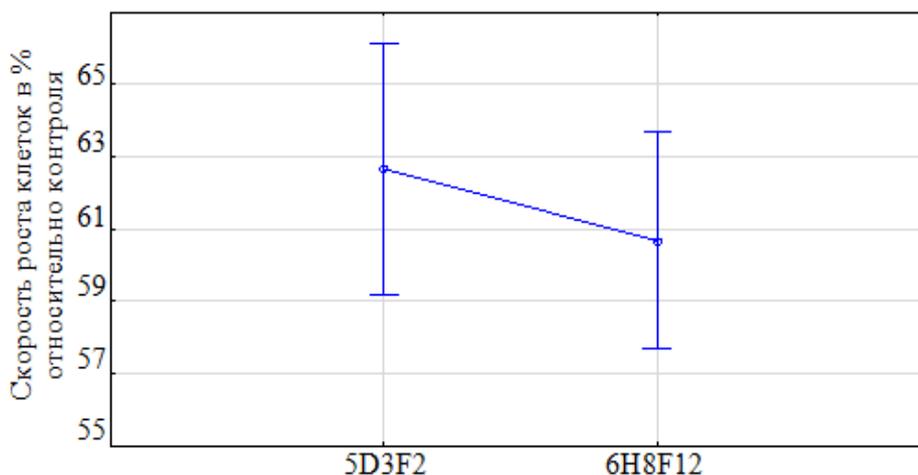


Рисунок 10 – Сравнение скорости роста клеток линии K562 при инкубировании в присутствии МКА 5D3F2, 6H8F12 к PRAME

По сравнению с K562 рост клеток других линий подавлялся статистически значимо меньше (рис. 8).

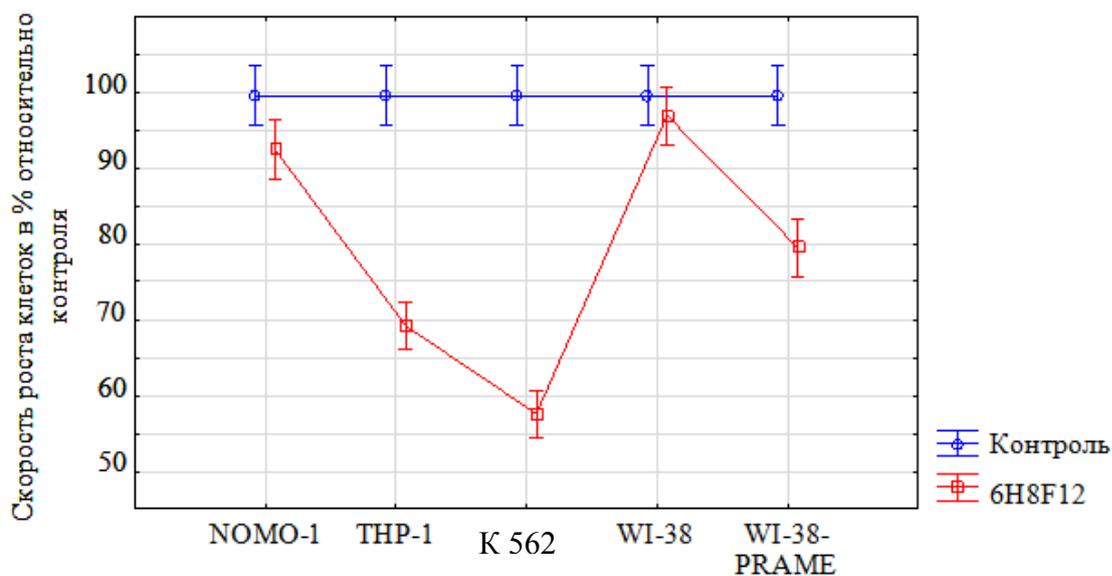


Рисунок 11 – Сравнение скорости роста клеток различных линий после 24 часов инкубирования в присутствии МКА 6H8F12. Начальная концентрация МКА к PRAME составила 12 мкг/мл.

Согласно данным МТТ-теста при инкубировании с МКА 6H8F12 наблюдалась значительная гибель клеток линий K562 и WI-38-PRAME. В обеих линиях при одинаковой концентрации МКА 5D3F2 и 6H8F12 к PRAME погибало сопоставимое количество клеток ($p=0,8405$) с тенденцией к меньшему выживанию клеток линии K562. В линии THP-1 наблюдалось меньшее число погибших клеток, чем в K562, но без статистически значимой разницы ($p=0,6335$). Часть клеток линии NOMO-1 также погибла, но количество мертвых клеток было статистически значимо меньше, чем в линии K562 ($p=0,0026$). При инкубировании с МКА 6H8F12 практически не изменилось соотношение количества мертвых и живых клеток в линии WI-38 ($p=0,8452$). Количество погибших клеток в линии WI-38 было статистически значимо меньше, чем в линии K562 ($p = 0,0005$) (рис. 12).

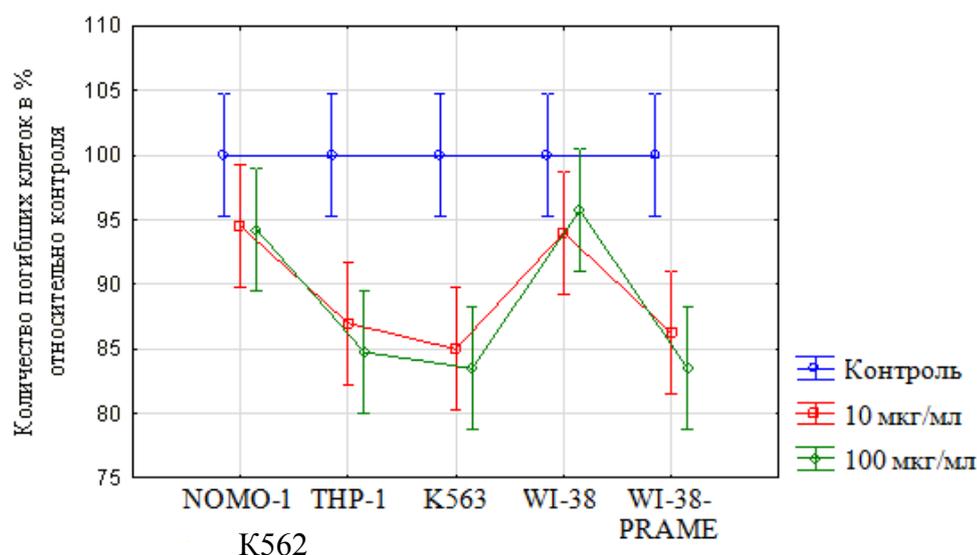


Рисунок 12 – Сравнение количества погибших клеток различных линий после 24 часов инкубирования в присутствии МКА6Н8F12 к PRAME. Начальная концентрация МКА к PRAME составила 10 мкг/мл.

Проведенные эксперименты подтвердили предположение о том, что моноклональные анти-PRAME-антитела оказали цитостатическое действие на линии, экспрессирующие PRAME. Это выразилось в замедлении скорости роста клеток, причем в прямой зависимости от уровня экспрессии гена *PRAME*.

Исследование влияния экспрессии гена *PRAME* на транскрипционный профиль WI-38 PRAME

С помощью метода микрочипов была определена экспрессия 15 тыс. генов. При анализе полученных данных основное внимание было обращено на группу генов, уровень экспрессии которых изменился более чем в два раза по сравнению с контролем. Результаты по изменению уровня экспрессии различных генов при трансфекции гена *PRAME* представлены в таблице 4.

Скорость роста клеток WI-38 после трансфекции геном *PRAME* увеличилась в два раза ($p=0,0304$).

Таблица 4– Изменения уровня экспрессии генов в линии WI-38 при трансфекции онкогена *PRAME*

Ген	Функции кодируемого белка	Изменение уровня экспрессии после трансфекции гена PRAME, кратность относительно контроля
<i>RAB2A</i>	Передача сигнала по RAS-зависимому пути	2,26
<i>SP110</i>	Активатор транскрипции генов	2,27
<i>GIP3</i>	Блокирование апоптоза	2,69

<i>MAGE A12</i>	Раково-тестикулярный антиген меланомы	4,36
<i>MAGE A6</i>	Раково-тестикулярный антиген меланомы	4,14
<i>MAGE A3</i>	Раково-тестикулярный антиген меланомы	4,86
<i>STAT1</i>	Передача сигнала по STAT-зависимому пути	3,65
<i>ACTINB</i>	Актин, компонент цитоскелета	2,07
<i>EMP2</i>	Митогенный фактор	2,03
<i>MAD2L1</i>	Положительный регулятор клеточного цикла	2,06
<i>BOP1</i>	Ингибитор дифференцировки	3,39
<i>PLAB</i>	Супрессор опухолевого роста	0,50
<i>TNRC6</i>	Супрессор опухолевого роста	0,49
<i>TNFAIP2</i>	Активатор апоптоза	0,48
<i>TNFAIP8</i>	Ингибитор апоптоза	2,06
<i>PCTK1</i>	Активатор апоптоза	0,44
<i>BNIP1</i>	Ингибитор апоптоза	2,78
<i>RIPK1</i>	Ингибитор апоптоза	2,88

Обнаружено, что ген *PRAME* повышает экспрессию опухолевых антигенов *MAGE-A3*, *MAGE-A6*, *MAGE-A12* (раково-тестикулярные антигены), *SCC-S2/GG2-1/NDED/ TNFAIP8*, *BNIP1*, *RIPK1*, *GIP3* (анти-апоптотические гены), *SP110* (ингибитор RAR α), *MAD2L1* (положительный регулятор клеточного цикла), *EMP2*, *IRF9*, *STAT1*, *RAB2* (митогенные и транскрипционные факторы), *BOP1* (увеличивает количество многополюсных веретен деления клеток, вызывая нестабильность генома), *ACTINB* (актин, структурный белок, необходимый для внутриклеточного транспорта и подвижности клеток). Кроме того, оказалось, что *PRAME* подавляет экспрессию генов *PLAB*, *PCTK1*, *TNFAIP2*, *TNRC6* (проапоптотические и дифференцировочные гены-супрессоры опухолевого роста). Таким образом, активация в клетках WI-38 гена *PRAME* приводит к повышению экспрессии групп генов, которые будут способствовать дальнейшей прогрессии опухоли.

Сохранение цитотоксической активности дендритных клеток после нагрузки рекомбинантным белком PRAME

Одним из важных свойств ДК является их цитотоксическое действие на опухолевые и чужеродные клетки. При получении противоопухолевых ДК-вакцин необходимо сохранить

полноценную функциональную активность ДК. Целью этой части работы была проверка возможности сохранить цитотоксическое действие ДК при нагрузке полученным нами рекомбинантным белком PRAME. При этом мы проводили сравнение рекомбинантного белка PRAMEс другим источником белка PRAME, а именно лизатом опухолевых клеток линии K562. В этой линии, как показали наши данные ПЦР анализа, имеется высокая спонтанная экспрессия белка PRAME. Для проведения эксперимента ДК были получены из мононуклеарных клеток донора. Затем проводили инкубацию ДК с опухолевыми линиями клеток. Предполагалось, что ДК, нагруженные белком PRAME, будут значительно подавлять рост быстрорастущих клеток K562, имеющих высокий уровень экспрессии гена *PRAME*. Однако ДК, нагруженные белком PRAME, при совместной инкубации с быстрорастущими лейкозными клетками K562 или U937 практически не проявили ожидаемого эффекта. В присутствии незрелых ДК отмечено увеличение скорости роста клеток (рис.13).

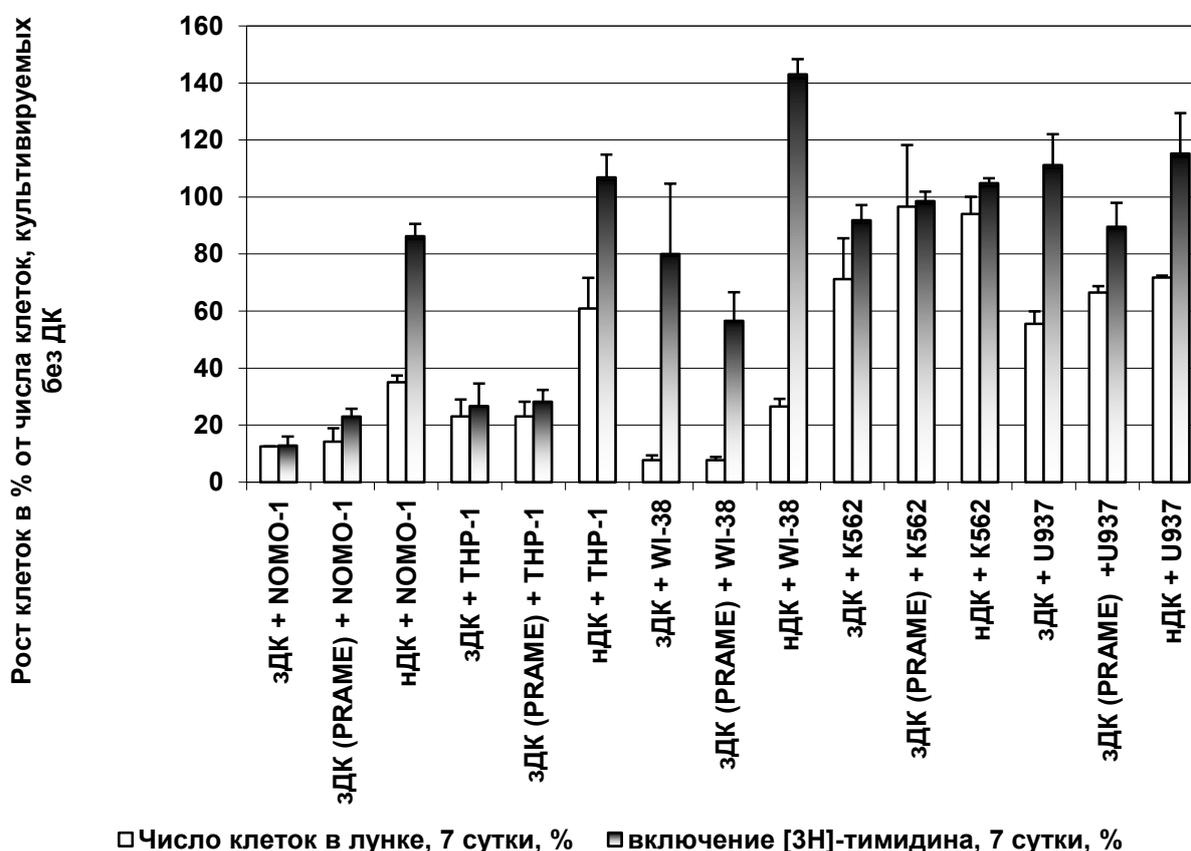


Рисунок 13 – Влияние дендритных клеток донора на рост клеток к 7 суткам инкубации, соотношение клеток при посеве 1:1 (по 5×10^3 клеток в лунке каждого вида клеток). зДК - зрелые дендритные клетки; зДК (PRAME) - зрелые дендритные клетки, нагруженные белком PRAME (по 8 мкг/мл среды); нДК - незрелые дендритные клетки, инкубировались в среде без цитокинов.

Одновременное увеличение в два раза плотности зрелых ДК и клеток-мишеней при их совместной инкубации усиливало цитотоксическое действие ДК на все клетки (рис. 11). Зрелые ненагруженные ДК, выделенные из крови донора, при культивировании в соотношении ДК: клетки-мишени 1:1 (по 10^4 в лунке каждого вида клеток) полностью подавили рост клеток NOMO-1, а рост остальных клеток был подавлен на 40-60%. Нагрузка ДК лизатом клеток K562 вызвала усиление действия ДК против клеток K562. При этом рост клеток других линий подавлялся слабее, чем при культивировании со зрелыми ненагруженными ДК. ДК, нагруженные белком PRAME, подавили рост клеток THP-1 и K562 на 60%, максимальное подавление наблюдали на клетках NOMO-1 и U937 (рис. 14).

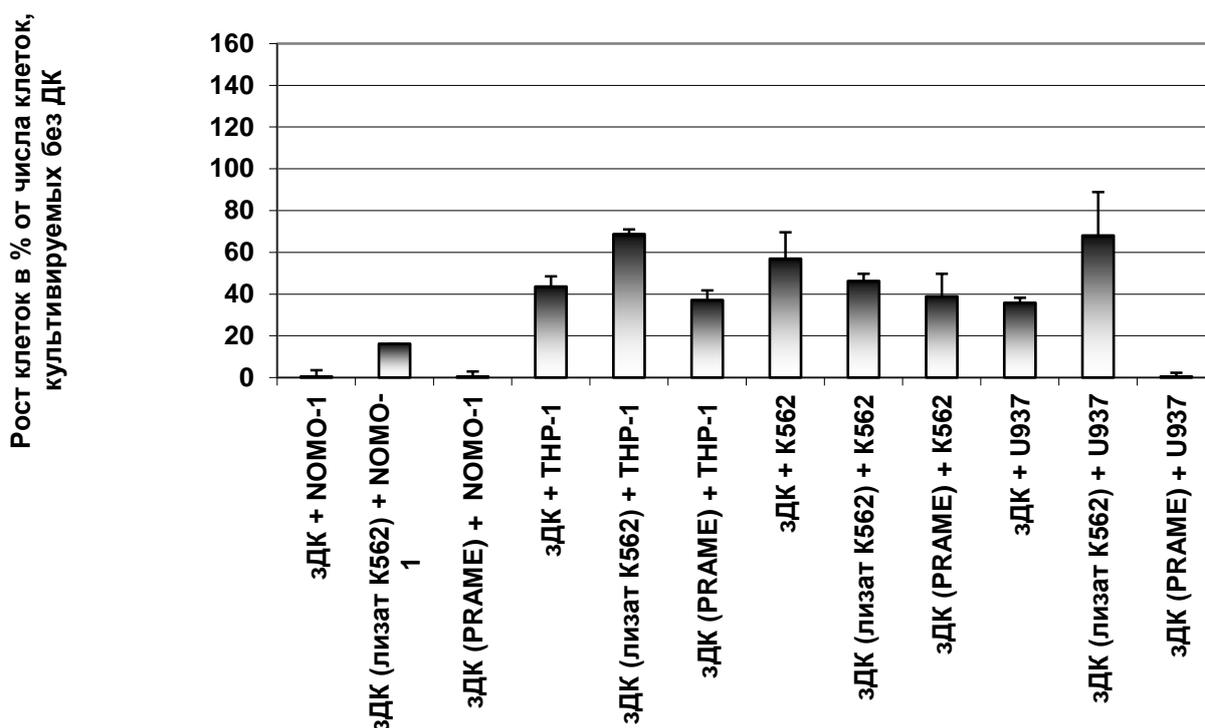


Рисунок 14 – Влияние дендритных клеток донора на линии клеток на 5 сутки инкубации при соотношении $10^4:10^4$. зДК - зрелые дендритные клетки; зДК (PRAME) - зрелые дендритные клетки, нагруженные белком PRAME; зДК (лизат K562) - зрелые дендритные клетки, нагруженные лизатом клеток K562.

Таким образом, при увеличении плотности линий, использованных в работе, нагрузка ДК специфическим опухолевым антигеном - белком PRAME, приводила к более сильному подавлению роста всех клеток по сравнению с ДК, не нагруженными PRAME, или нагруженных лизатом клеток линии K562. ДК, нагруженные лизатом клеток K562, подавляли рост клеток K562, но слабее по сравнению с ДК, нагруженными рекомбинантным PRAME. Нагрузка ДК лизатом клеток K562 вызывала более слабое подавление роста других линий

клеток по сравнению с ДК без нагрузки или нагруженных белком PRAME. На микрофотографиях клеток, сделанных в конце инкубации (рис. 15), видно, что там, где воздействие ДК оценивалось как сильное, меняется плотность линий, заметно изменяется морфология клеток.

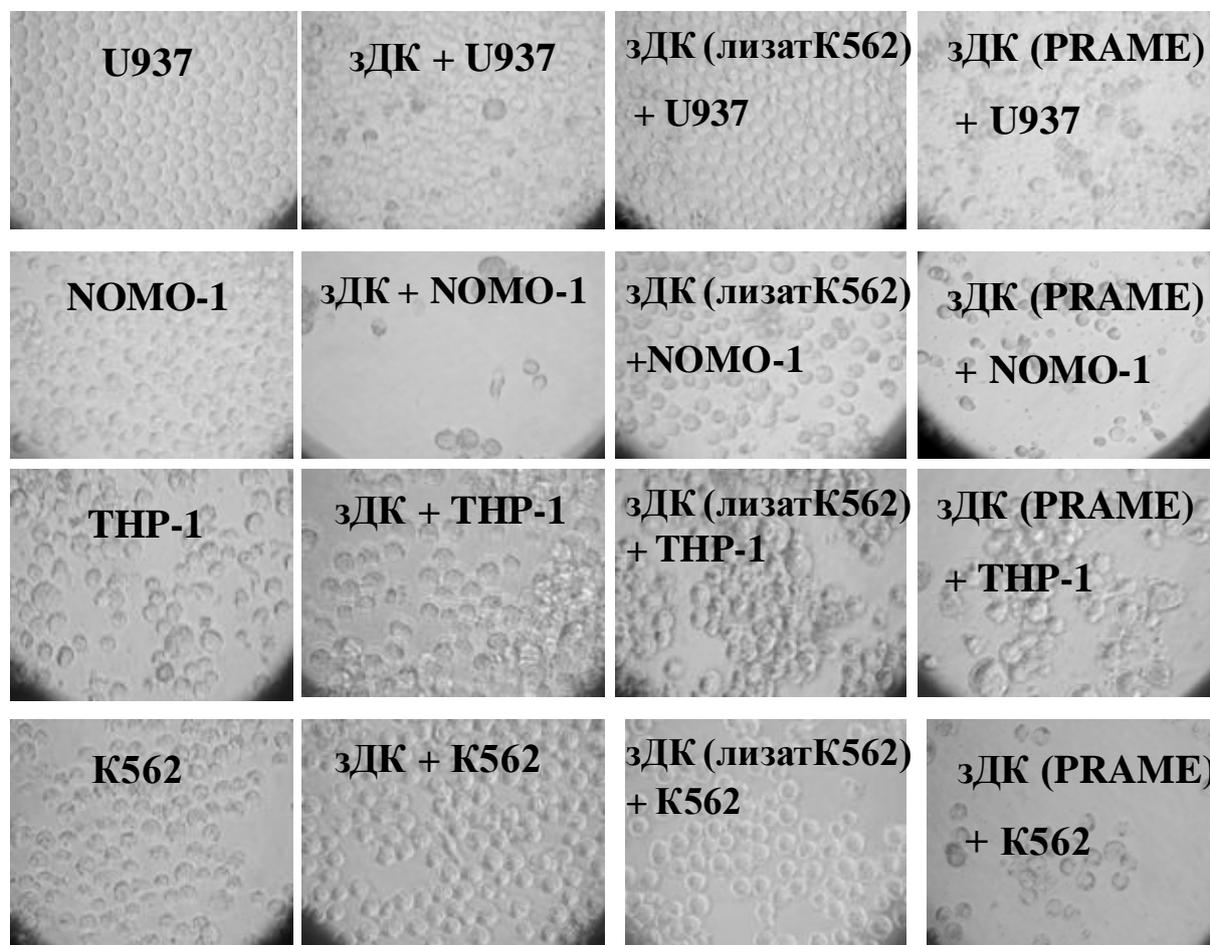
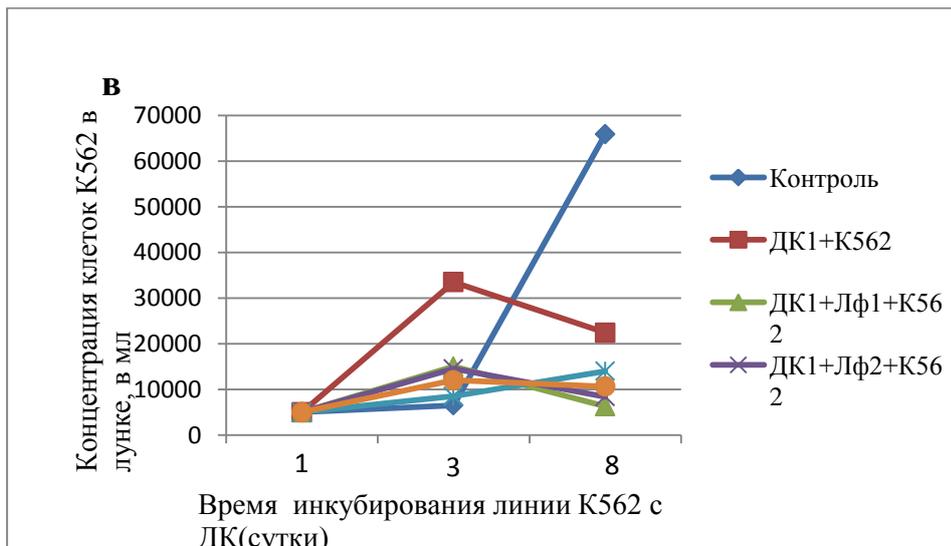
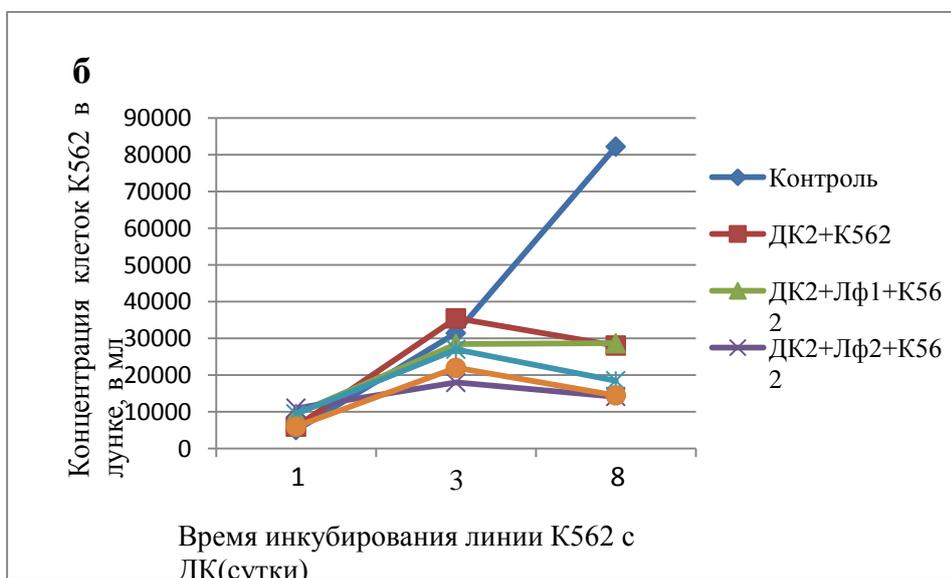
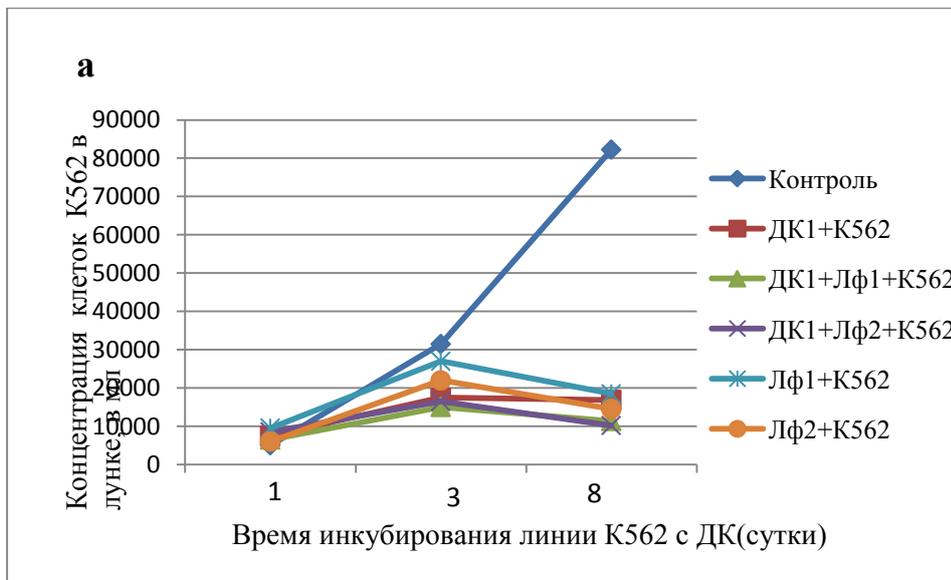


Рисунок 15 – Микрофотография клеток на 5 сутки инкубации при соотношении при посевах $10^4:10^4$. зДК – зрелые дендритные клетки; зДК (PRAME) – зрелые дендритные клетки, нагруженные белком PRAME; зДК (лизат K562) – зрелые дендритные клетки, нагруженные лизатом клеток K562.

При увеличении соотношения ДК: K562=5:1 ($2,5 \times 10^4: 5 \times 10^3$) цитотоксическое действие ДК было значительным. Незрелые ДК, нагруженные белком PRAME, слабее подавляли рост клеток по сравнению с ненагруженными ДК (рис. 16, а). Напротив, зрелые ДК, нагруженные белком PRAME, и затем инкубированные с ФНО-альфа и ПГЕ₂, оказывали более сильное цитотоксическое действие (рис. 16, б). Если после нагрузки белком PRAME ДК не подвергались терминальной дифференцировке, то их действие на клетки K562 было слабым. Ещё большее цитотоксическое действие ДК на клетки опухолей проявлялось после добавления лимфоцитов донора к смеси клеток ДК+K562. При этом действие лимфоцитов, предварительно активированных ИЛ-2, в данном случае не отличалось от не активированных лимфоцитов.



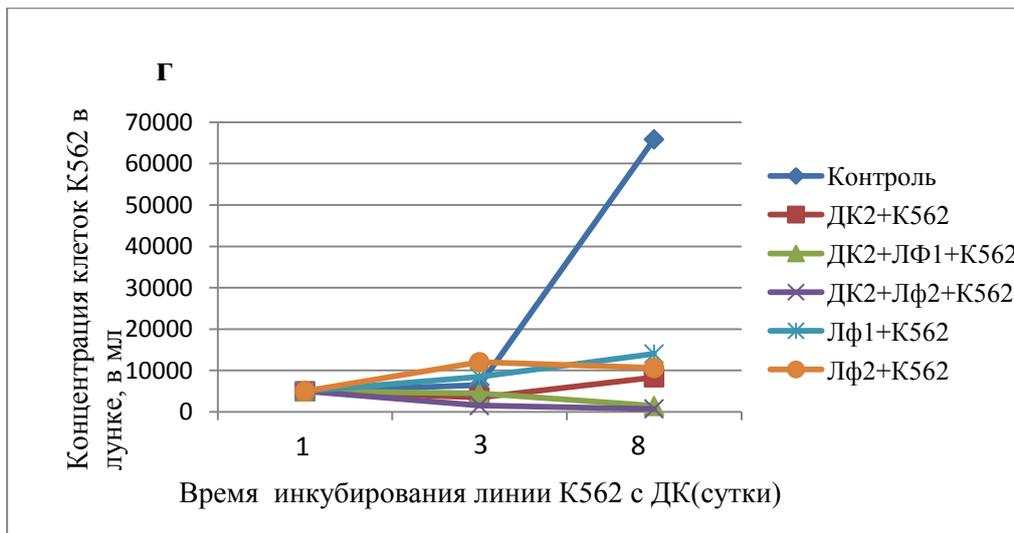


Рисунок 16 – Уровень пролиферации клеток K562 при совместной инкубации с незрелыми и зрелыми дендритными клетками и лимфоцитами. Соотношение клеток при посеве $2,5 \times 10^4$ ДК: 5×10^3 K562, 5×10^4 Лф. Контроль- линия K562. Лф – лимфоциты, инкубированные в среде без ИЛ-2, Лф (ИЛ-2) – лимфоциты, инкубированные с 10 ед/мл ИЛ-2 до инкубации с ДК. **а**– ДК1 – незрелые дендритные клетки, инкубированные с 80 нг/мл ГМ-КСФ и 10 нг/мл ИЛ-4; **б** – ДК 2 – незрелые дендритные клетки, инкубированные с ГМ-КСФ и ИЛ-4, затем нагружались белком PRAME; **в** и **г**– ДК1 – зрелые дендритные клетки, ДК 2– зрелые клетки, нагруженные белком PRAME.

Клетки костного мозга больного ОММЛ получили через 2 месяца после установления диагноза и проведения 3 курсов химиотерапии. У пациента уровень экспрессии гена PRAME в дебюте заболевания составлял 3,3%, а в день взятия КМ для выделения ДК экспрессия гена PRAME была существенно ниже - около $4,32 \times 10^{-3}$ PRAME/Ab1%. Была проведена совместная инкубация ДК, полученных из периферической крови донора и линии опухолевых клеток K562. Сравнивали влияние плотности и соотношения ДК к клеткам K562 на рост клеток K562 (рис. 17).

При совместной инкубации в соотношении 1:1 число клеток K562 уменьшалось в 2,5 раза по сравнению с контролем. Увеличение концентрации зрелых ДК до соотношения 3:1 относительно исходной концентрации клеток K562 (5×10^3 в лунке) приводило к снижению числа клеток K562 к 7 суткам инкубации почти в 7 раз (рис.17 **а**). При повышении исходной концентрации ДК и клеток K562 до 10^4 или $1,5 \times 10^4$ влияние ДК было слабее. Нагрузка ДК белком PRAME при инкубации с K562 не дала значительного преимущества по сравнению со зрелыми ДК, ненагруженными антигеном (рис. 17 **б**). Таким образом, нагруженные белком PRAME ДК (полученные из мононуклеаров ПК донора, так и полученные из костного мозга

больных лейкозами) сохраняют способность к цитотоксическому действию против опухолевых клеток, а в ряде случаев наблюдали даже некоторое усиление этого эффекта.

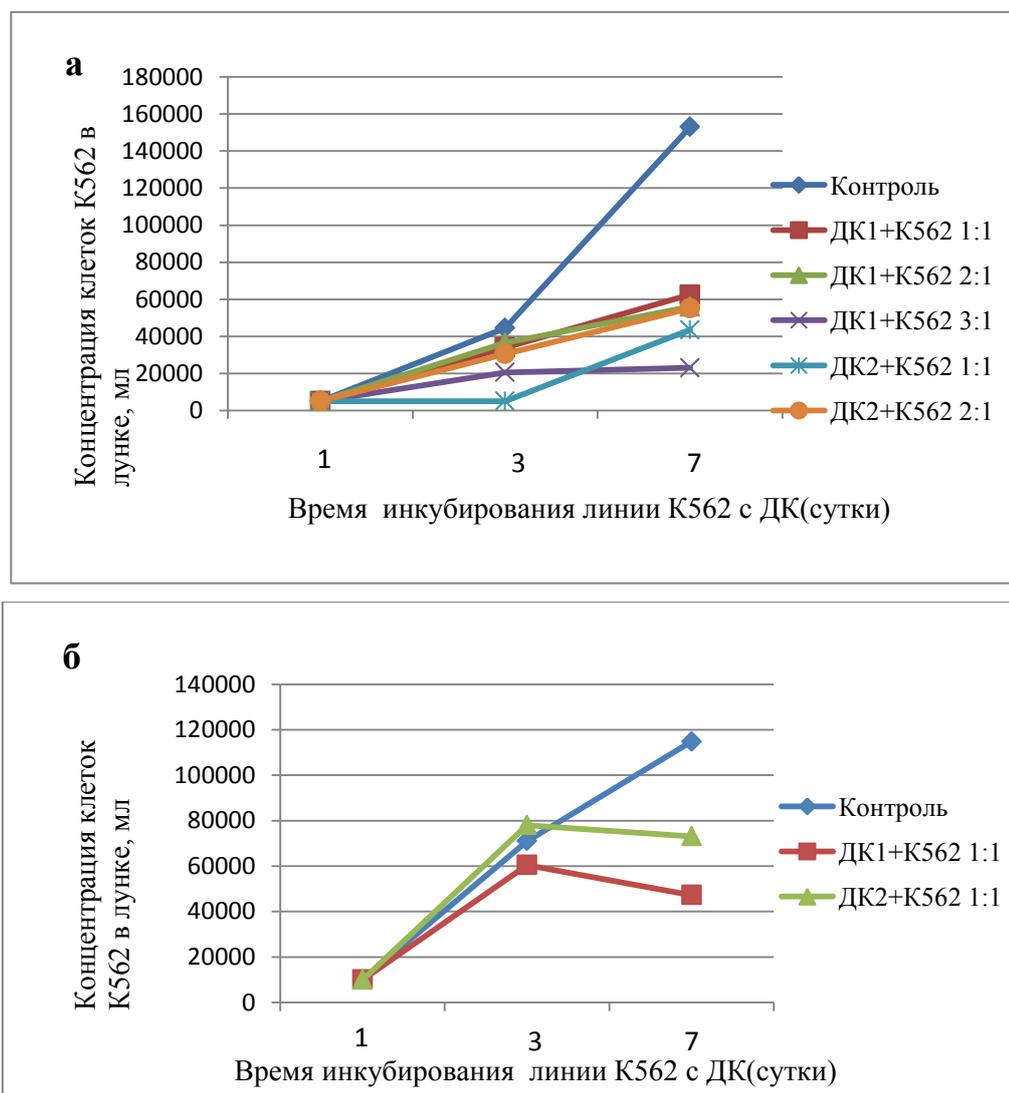


Рисунок 17 – Влияние дендритных клеток, полученных из костного мозга больного ОММЛ, на рост клеток K562 на 3 и 7 сутки совместной инкубации при разной плотности и соотношении клеток. **а**– концентрация клеток K562 составила 5000/мл; **б**– концентрация клеток K562 составила 10000/мл. ДК 1 – зрелые дендритные клетки; ДК 2 – зрелые дендритные клетки, нагруженные белком PRAME.

ВЫВОДЫ

1. Белок PRAME в клетках опухолевых линий K562, melCor, B16F10PRAME, WI-38 PRAME, а так же в костном мозге больных острыми лейкозами расположен как внутриклеточно (в ядре и цитоплазме), так и на поверхности цитоплазматической мембраны.

2. Моноклональные антитела 5D3F2 и 6H8F12 оказывают цитостатическое действие на PRAME-экспрессирующие опухолевые клетки, причем в наибольшей степени были подвержены гибели клетки линий K562 и WI-38PRAME ($p=0,8405$). В клетках линий THP-1($p=0,6335$) и NOMO-1($p=0,0026$) наблюдалось меньшее число погибших клеток, чем в K562. Количество погибших клеток в линии WI-38 было статистически значимо меньше, чем в линии K562 ($p=0,0005$).

3. Ген *PRAME* вызывает активацию группы генов (*MAGE-A3*, *MAGE-A6*, *MAGE-A12*, *TNFAIP8*, *BNIP1*, *RIPK1*, *GIP3*, *SP110*, *MAD2L1*, *EMP2*, *IRF9*, *STAT1*, *RAB2*, *BOPI*, *ACTINB*), способствующих прогрессии опухоли.

4. Дендритные клетки после нагрузки рекомбинантным белком PRAME сохраняют и в ряде случаев увеличивают цитотоксическую активность.

5. Проявление цитотоксического действия дендритных клеток прямо зависит от степени зрелости ДК и величины соотношения ДК: клетки опухоли.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В ЖУРНАЛАХ, РЕКОМЕНДАННЫХ ПЕРЕЧНЕМ ВАК ПРИ МИНОБРНАУКИ РОССИИ

1. Ахлынина Т.В. Наличие иммуногенного антигена в опухолевой клетке способствует антипролиферативному действию дендритных клеток./ Т.В.Ахлынина, А.В. Мисюрин., **Н.А.Лыжко**, Ю.П.Финашутина., В.А. Мисюрин, Е.В.Аксенова., И.Н.Солдатова., А.П. Шпакова., Б.Б. Хасигова, Т.И. Булычева., О.С. Бурова. // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 4. – С. 23-30.

2. Финашутина Ю.П. Получение рекомбинантного раково-тестикулярного белка PRAME и моноклональных антител к нему./ Ю.П.Финашутина., А.В. Мисюрин, Т.В. Ахлынина, **Н.А. Лыжко**, А.А. Крутов, Е.В. Аксенова, В.А. Мисюрин, А.Ю. Барышников.// Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 3. – С. 29-37.

3. Лыжко Н.А. Повышение уровня экспрессия гена *PRAME* в опухолевых клетках сопровождается локализацией белка в клеточном ядре./ **Н. А. Лыжко**, Т.В. Ахлынина., А.В. Мисюрин., Ю.П. Финашутина., Е.В.Аксенова, И.Н. Солдатова, В.А. Мисюрин., А.Ю.Барышников. // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 4. – С. 19-30.

4. Лыжко Н.А. Проявление цитостатического эффекта моноклональных антител к белку *prame*. / **Н.А. Лыжко**., В.А. Мисюрин., Ю.П. Финашутина., Т.В. Ахлынина., Л.А. Кесаева., В.В.Тихонова, Н.Н.Касаткина, О.Н.Солопова, М.А. Барышникова. // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15, № 4. – С 53-58.