

УДК 616-006.04-006.2
УКПП
№ держреєстрації № 0117U003937
Інв. №

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ (СумДУ)
40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2
тел. (0542) 33-35-39 факс. (0542) 33-40-58
e-mail: info@sci.sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з наукової роботи
д-р фіз.-мат. наук, професор

_____ Черноус А.М.

ЗВІТ

ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

Розробка методу діагностики пухлин органів репродуктивної системи з використанням молекул клітинної адгезії раково-ембріонального антигену

ПРОВЕДЕННЯ УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА СТВОРЕННЯ АЛГОРИТМІВ ДІАГНОСТИКИ

(остаточний)

Науковий керівник
канд.мед наук, доцент

Р.А. Москаленко

2020

Рукопис закінчено 18 вересня 2020 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол №2 від 24.09.2020 р.

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, гол. наук. співроб., док.мед. наук	_____	Р.А.Москаленко (розділи 1-7)
	(12.10.2020)	
Відповідальний виконавець ст. наук. співроб., канд. мед. наук,	_____	М.С. Линлін (розділи 1-7)
	(12.10.2020)	
Ст. наук співроб., канд. мед. наук	_____	В.В. Сікора (розділ 1,2,3)
	(12.10.2020)	
Молодший наук. співроб.	_____	А.М. Піддубний (розділ 4,5)
	(12.10.2020)	
Наук. співроб., док.мед. наук	_____	Є.В. Кузенко (розділ 3,5,7)
	(12.10.2020)	
Мол. наук. співроб., канд. мед. наук	_____	Ю.М. Линдіна (розділ 6)
	(12.10.2020)	
Молодший наук. співроб.	_____	К.О. Сікора (розділ 5)
	(12.10.2020)	
Молодший наук. співроб.	_____	О.О. Гудименко (розділ 7)
	(12.10.2020)	
Лаборант	_____	О.А. Ворожко (розділ 4)
	(12.10.2020)	
Лаборант	_____	А.М. Круш (розділ 6)
	(12.10.2020)	
Лаборант	_____	Д.Р. Гирявенко (розділ 6)
	(12.10.2020)	
Лаборант	_____	Т.Р. Савченко (розділ 4)
	(12.10.2020)	

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 150 с., 53 рис., 144 джерела.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ, МАТКА, МАТКОВІ ТРУБИ, МОЛОЧНА ЗАЛОЗА, ПРОСТАТА, СЕАСАМ.

Об'єкт дослідження – злоякісні пухлини органів репродуктивної системи людини.

Предмет досліджень – особливості морфогенезу злоякісних пухлин органів репродуктивної системи, гістологічна характеристика неопластичних процесів та їх імунофенотип, взаємозв'язок між показниками імуноферментного аналізу біологічних рідин та рецепторним профілем пухлинної тканини.

Мета роботи – оптимізація морфологічної діагностики перебігу злоякісних пухлин органів репродуктивної системи на різних етапах розвитку шляхом дослідження різних молекул адгезії раково-ембріонального антигену у біологічних рідинах та неопластичній тканині, встановлення їх участі в ініціюванні та прогресуванні ракових процесів.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

- Формування груп пацієнтів згідно дизайну дослідження;
- Проведення морфологічного дослідження та імунофенотипування зразків тканин пухлин;
- Вивчення СЕАСАМ у біологічних рідинах пацієнтів;
- Проведення порівняльного аналізу отриманих даних, оцінка їх взаємозв'язку;
- Виявлення диференційно-діагностичних СЕАСАМ для кожного виду злоякісного процесу;
- Створення алгоритмів діагностики неоплазій органів репродуктивної системи.

Методи дослідження – гістологічні, імуногістохімічні, імуноферментні, бактеріологічні, молекулярно-генетичні, математичні.

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень і скорочень-----	5
1 Загальна характеристика білків сімейства раково-ембріонального антигену та їх регуляції-----	7
1.1 Відомості про білки сімейства СЕА-----	7
1.2 Регуляція активності СЕАСАМ-----	14
1.3 Молекулярна характеристика та експресія СЕАСАМ у нормі -----	18
1.4 Функції СЕАСАМ-----	24
1.5 Використання СЕАСАМ в імунотерапії та діагностиці -----	24
1.6 Експресія СЕАСАМ у пухлинах органів репродуктивної системи--	27
1.6.1 Молочна залоза-----	29
1.6.2 Матка-----	34
1.6.3 Яєчники-----	37
1.6.4 Яєчка-----	38
1.6.5 Передміхурова залоза-----	39
2 Епідеміологічні особливості пухлин репродуктивної системи-----	42
2.1.Епідеміологічні особливості раку молочної залози-----	42
2.2.Епідеміологічна характеристика первинного раку маткових труб----	43
2.3 Епідеміологічна характеристика раку передміхурової залози-----	46
2.4 Епідеміологічна особливості ендометріальних карцином-----	49
2.5 Захворюваність на злоякісні пухлини яєчка-----	51
3 Участь СЕАСАМ у прогресуванні раку молочної залози-----	54
4 Встановлення прогностичного значення експресії СЕАСАМ1, СЕАСАМ5 та СЕАСАМ6 у тканині ендометрію-----	65
5 Участь СЕАСАМ1 у функціонуванні судин-----	74
6 Використання флюорофор-кон'югованих антитіл до СЕАСАМ при ідентифікації злоякісних пухлин та їх метастазів-----	91
7 Дослідження участі СЕАСАМ людини з бактеріальними білковими доменами-----	106
Перелік джерел посилання-----	134

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

ІГХ	Імуногістохімія
КРР	Колоректальний рак
ММР	Матриксна металопротеїназа 9
МСЦ	Мікросудинна щільність
НДКРЛ	Недрібноклітинний рак легень
ПКМ	Позаклітинний матрикс
РМЗ	Рак молочної залози
РПЗ	Рак передміхурової залози
ХпКФ	Хірургія під контролем флуоресценції
Співвідношення СЕАСАМ1-L/S	Співвідношення між СЕАСАМ1-L та СЕАСАМ1-S
BGP	Біліарний глікопротеїд
CEA	Раково-ембріональний антиген
CEASAM/s	Молекула/и клітинної адгезії раково-ембріонального антигену
sCEASAM1	Секреторна форма СЕАСАМ1
CD	Кластер диференціювання
EGFR	Рецептори епітеліального фактора росту
ER	Рецептори до естрогену
Her2/neu	Рецептори другого типу людського епідермального фактора росту
Ig	Імуноглобулін
IL	Інтерлейкін 1
IR	Інсулінові рецептори
ITIM/ITAM/ ITSM	Імунорецепторний мотив інгібування/активації/перемикання на основі тирозину
mAb/mAbs	Моноклональне антитіло/а

NCA	Неспецифічний перехресно-реаквальний антиген
NK	Природні кілери
PR	Рецептори до прогестерону
PSG	Специфічні для вагітності глікопротеїди
VEGF	Судинний ендотеліальний фактор росту

1 ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА БІЛКІВ СІМЕЙСТВА РАКОВО-ЕМБРІОНАЛЬНОГО АНТИГЕНУ ТА ЇХ РЕГУЛЯЦІЇ

1.1 Відомості про білки сімейства СЕА

Минуло вже понад 55 років, як учені P. Gold та Freedman S. опублікували дані щодо специфічних пухлинних антигенів у тканині колоректального раку (КРР). Використовуючи ряд імунологічних методик, вони виявили, що екстракти як первинної, так і метастатичної пухлини гальмують активність преципітину, що утворюється між пухлинним екстрактом й антитілами, синтезованими до них. Окрім карцином, активність преципітину також виявлялася в тканинах кишківника, печінки та підшлункової залози плодів людини на 6-му місяці вагітності. Враховуючи це, дослідники дали назву цьому маркеру «раково-ембріональний антиген» (carcinoembryonic antigen – СЕА) [1]. Вони вважали, що СЕА експресується виключно клітинами упродовж фетального періоду, відсутній у здорових тканинах дорослих осіб та реекспресується в карциномах. Згодом цій дослідницькій групі вдалося визначити рівень СЕА в сироватці крові осіб із КРР та іншими злоякісними пухлинами, використовуючи радіоімунологічні методи дослідження [2]. Кров від здорових осіб та пацієнтів з іншими захворюваннями зазвичай містила менший рівень СЕА. Це становило значний інтерес до цього маркера з боку клініцистів, які почали широко використовувати його визначення в крові хворих під час діагностики, стадіювання, моніторингу та прогнозування перебігу злоякісних пухлин [3].

У подальшому основними напрямками досліджень стали очищення та характеризування цих білків. Оскільки вони є складними високоглікозильованими макромолекулами, це було непростим завданням. Кілька груп учених зробили вагомий внесок у цьому напрямку, і СЕА було визначено як глікопротеїд, що містить приблизно 50 % вуглеводів із молекулярною масою близько 200 кДа [4,5]. Наступним не менш важливим питанням було встановлення крос-реактивності СЕА з іншими білками в

нормальних тканинах людини, включаючи кров. Очевидно, що наявність такої їх хибної властивості на той час могла сприяти одержанню хибних результатів у клінічній практиці.

Очищення пухлинних екстрактів, виконане одночасно двома незалежними групами дослідників J. P. Mach та ін. і S. Kleist та ін., свідчило про наявність іншого антигену в більшості випадків злякисних пухлин кишківника, що не виявляв ані пухлинної, ані органної специфічності. Його позначали як «неспецифічний перехресно-реаквальний антиген» (nonspecific cross-reacting antigen – NCA або CD66c) [6,7]. Наявність цього глікопротеїду в сироватці крові у 85 % осіб із КРР подавала надії скринінгового обстеження великої кількості пацієнтів за допомогою радіоімунологічних досліджень [8]. Упродовж наступних років було виявлено значну кількість перехресно-реаквальних антигенів у інших пухлинах, що мали підвищену СЕА-подібну активність. Це поставило під сумнів можливість використання радіоімунологічних досліджень у клінічній практичній діяльності.

Незважаючи на наявні перешкоди в специфічності антитіл та варіабельності СЕА в разі виникнення злякисних пухлин у кишківнику, незабаром було виявлено, що сту-пінчасте підвищення його рівня після хірургічного лікування хворих із КРР свідчить про рецидивування пухлин та/або віддалене метастатичне їх поширення [9]. Це стало стандартною практикою в післяопераційному спостереженні хворих із цією патологією.

Наступним представником СЕА-подібних білків, який був ідентифікований групою вчених під керівництвом Т. Svenberg у жовчі хворих на обструктивну жовтяницю, був біліарний глікопротеїн (biliary glycoprotein – BGP) [10, 11].

Однак відсутність специфічних моноклональних антитіл (monoclonal antibodies – mAbs) на той час не дозволяла відокремити їх від СЕА та NCA за рахунок вираженої крос-реактивності. Насправді ж перші mAbs, які могли ідентифікувати виключно BGP, були винайдені групою вчених під керівництвом С. Wagener [12, 13]. Клонування кДНК BGP дозволило виявити

більше ніж 80 % гомологій на нуклеотидному рівні з відповідними доменами в СЕА та NCA. Лише BGP-специфічний домен A2 має 56 % гомологій із доменами інших членів сімейства СЕА [14]. За допомогою імунофлуоресцентних досліджень встановлено, що джерелом BGP у печінці є жовчні капіляри, клітини жовчних протоків та слизова оболонка жовчного міхура [15]. Патерни експресії цих білків у людини також були виявлені (підтверджені) в гризунів [16, 17].

Наступні десятиліття були присвячені характеристиці СЕА-подібних білків та синтезу різноманітних mAbs до них [18]. Це стало підґрунтям до клонування кДНК СЕА та їх бібліографії, отриманих із клітин КРР [19,20]. Набутий досвід найближчим часом сприяв клонуванню ряду інших членів сімейства СЕА, таких як NCA [21] та BGP [22], із різних форм лейкоцитів.

Кінець 70-х років та початок 80-х років ХХ ст. запам'ятався широкомасштабними дослідженнями СЕА, NCA та BGP у різних типах пухлин, пізніше перейменованих на молекули клітинної адгезії раково-ембріонального антигену 5 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule – CEACAM), CEACAM6 та CEACAM1 відповідно. Важливий внесок у цьому напрямку зробили D. M. Goldenberg, J. P. Mach та R. H. Begent, які визначили ці білки як надійний маркер у виявленні первинного й метастатичного КРР та інших злоякісних пухлин і спробували їх використати в імунотерапії (за допомогою анти-СЕА антитіл) цих новоутворень [23–25].

Велике сімейство СЕА закодоване у 29 окремих генах/псевдогенах, розміщених на довгому плечі хромосоми 19q13.1–13.2 людини, сьомій хромосомі в мишей та першій хромосомі в щурів [26]. Вони розділені між трьома підгрупами генів: Сеасам (12 незалежних генів – Сеасам1, 3–8, 16, 18–21), специфічних для вагітності глікопротеїдів (pregnancy-specific glycoproteins – Psg) – 11 генів та третьою підгрупою генів Сgm (СЕА gene family member), яка кодує 6 представників СЕА-подібних білків. Серед 12 генів Сеасам, експресуються лише 7 (Сеасам1, 3–8), тоді як 5 інших є псевдогенами. У підгрупі Psg усі гени є експресованими, тоді як у третій

підгрупі всі представники є псевдогенами [27–30]. Гени Psg та третьої підгрупи розміщені більш теломерально до генів підгрупи Ceacam. Усі вони організовані двома кластерами по 250 і 850 kb, розділені ділянкою приблизно 700 kb, що містять кілька неспоріднених генів [31]. Ceacam3–6 та 7 тісно кластеризовані в проксимальному кластері, тоді як Ceacam1, 8 та Psg/Cgm кластеризовані в дистальному кластері [26].

Окрім людини, різні представники CEACAM були виявлені у 27 інших ссавців, серед яких вони найкраще описані в мишей, щурів, великої рогатої худоби, собак, качкодзьобів та опосумів [26].

Усі білки CEACAM належать до сімейства SEA, під-групи SEA, суперсімейства імуноглобулінів (immunoglobulin – Ig). Вони є високоглікозильованими і зазвичай мають один варіабельний (V)-подібний домен, позначений як N-домен (за винятком CEACAM16, який містить два N-домени), що складається із 108 амінокислот (рис. 1.1). За N-доменом розміщених від одного до шести константних C2-подібних доменів. Вони можуть бути типів A та B, що містять по 85 та 93 амінокислоти відповідно. Молекули CEACAM та PSG відрізняються саме C-термінальними кінцями [32].

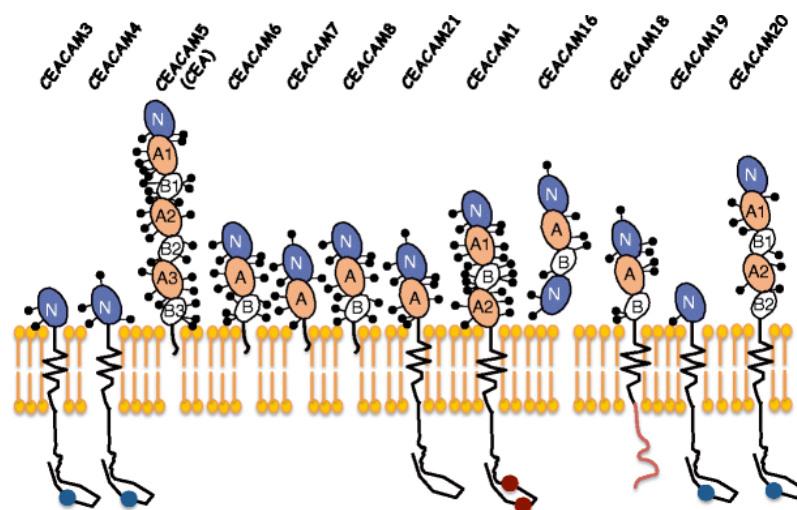


Рисунок 1.1 – Представники CEACAM у людини [32]:

N – варіабельний домен; A, B – константні домени

Необхідно зазначити, що CEACAM3, 4 та 19 не мають константних доменів [33]. Ці позаклітинні структури необхідні для функціонування CEACAM як гомофільних та гетерофільних молекул міжклітинної адгезії [34], а також як рецепторів до збудників у людини і гризунів [35].

Підгрупа PSG охоплює здебільшого CEA-подібні білки в живих організмів із гемохоріальною плацентацією [26]. Вони беруть участь у розпізнаванні плода материнським організмом та регулюванні імунної відповіді в разі його імплантації й існування (імунологічної толерантності) [27,36]. Основним місцем їх утворення є плацента, особливо упродовж першого триместру вагітності – рівень PSG у крові жінок у цей термін найвищий. Синтез цих білків лімітований синцитіотрофобластом [37]. Крім того, їх утворення виявлено не лише в плаценті – клони кДНК-білків PSG були ізольовані з фетальної печінки, слинних залоз, яєчок та мієлоїдних клітин [38]. Швидше за все, рівень PSG у цих органах низький для виявлення їх імуногістохімічними методами. Крім того, зростання рівня PSG у крові встановлено при міхуровому занеску та хоріонепітеліомі [39].

У людини вісім з одинадцяти PSG містять амінокислотну послідовність аргінін-гліцин-аспарагінову кислоту (АГА) на збереженому та відкритому сайті N-домену. Ці трипептидні послідовності є місцем розпізнавання під час взаємодії позаклітинного матриксу (ПКМ) та деякими інтегринами. Припускають, що PSG діють як інгібітори клітино-матричних взаємодій. Однак дослідження щодо клонування кДНК молекул PSG від бабуїнів демонструють, що в них є майже стільки ж PSG, як і в людей, але лише один із них містить послідовності АГА в N-доміні [27]. Враховуючи це, видається малоімовірним, що ця послідовність має безпосереднє значення для функціонування молекул PSG у приматів.

Фіксація до мембрани є відмінною особливістю білків CEACAM. CEACAM5, 6, 7 та 8 зв'язані з мембраною клітин через глікозилфосфатидилінозитольний (glycosylphosphatidylinositol – GPI) зв'язок – напівпроникний мембранний зв'язок. Висловлюється припущення, що GPI-

зв'язок молекул CEACAM5 виник у результаті мутації гена CEACAM1 у його екзоні, що відповідає за трансмембранне прикріплення цих білків [40]. Важливо зазначити, що мутація є нещодавньою еволюційною подією в цьому сімействі генів, оскільки жоден із представників GPI-зв'язаних білків CEACAM не трапляється в геномі мишей [26].

Шість представників CEACAM (CEACAM1, 3, 4, 18–21) прикріплені до клітинної мембрани через надійні трансмембранні домени. CEACAM16 представлений виключно секреторною формою. Необхідно зазначити, що CEACAM1, 5, 6 та 8 можуть трапляються також у розчинній формі. Трансмембранний CEACAM17, а також розчинні (не фіксовані з мембраною клітин) CEACAM9-15 існують лише в щурів та мишей, у людей їх не виявлено. CEACAM2 досліджено виключно в мишей [32]. Варіації експресії різних молекул CEACAM у людей, щурів та мишей зображено на рисунку 1.2.

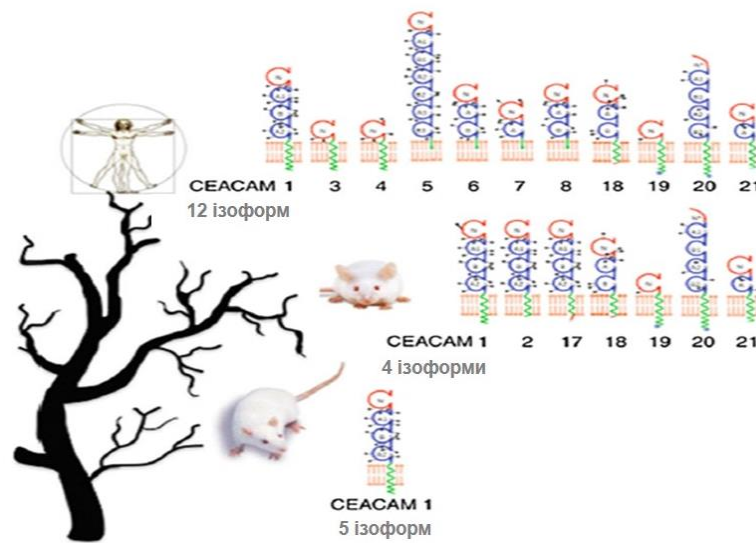


Рисунок 1.2 – Мембранозв'язані представники сімейства CEА,
що експресуються в людей, мишей та щурів [41]

Первинна структура CEACAM1 підлягає альтернативному сплайсингу, генеруючи 12 різних ізоформ цього білка в людини (рис. 1.3).

За винятком дуже подібних N-доменів, особливості прикріплення до мембрани та кількість сайтів глікозилювання різні в усіх членів сімейства

SEA. A3/B3-домени молекул CEACAM5 з'єднуються з протилежним N-доменом іншої молекули CEACAM5, беручи участь у міжклітинній адгезії [42]. Тоді як C2-подібні домени CEACAM1, 5 та 6 опосередковують асоціацію з іншими клітинними рецепторами, які беруть участь у фосфоїнозитид-3-кіназній (а phosphatidylinositide 3-kinase – PI3K) взаємодії з бактеріями [43]. Це передбачає низку можливих cis- (у межах однієї клітини) або trans-спрямованих (міжклітинних) взаємодій клітин посередництвом позаклітинних доменів різних видів CEACAM, що може сприяти різноманітності виконуваних ними функцій [32].

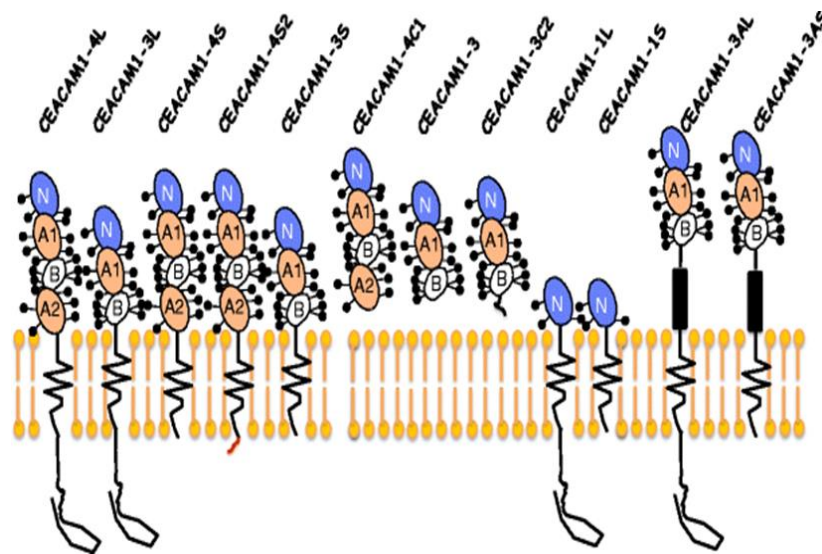


Рисунок 1.3 – Ізоформи CEACAM1 у людини [44]

Хоча члени сімейства SEA були виявлені більше ніж пів століття тому, і багато специфічних mAbs були синтезовані до цих білків, їх дуже подібні структурні особливості до недавнього часу перешкоджали належному визначенню їх експресії як у нормальній, так і в пухлинній тканинах. Наявність клітин ссавців, трансфектованих більшістю представників CEACAM, і генерування мутантних білків сприяли детальному визначенню їх відповідних функцій [45].

Білки CEACAM, у формі як гомо- (взаємодія між CEACAM одного виду) та гетеродимерів (взаємодія між різними представниками CEACAM), так і

олігомерів, можуть взаємодіяти з іншими рецепторами (білками) на мембранах клітин та брати участь у модулюванні важливих функцій.

Дослідження, проведені S. Hammarstrom та ін., демонструють виключно апікальну експресію CEACAM1, 5 та 6 в епітелії зрілих ентероцитів [27]. Більше того, використовуючи високочутливі методи дослідження, виявлено виникнення мікровезикул на апікальній поверхні клітин, що утворюються внаслідок від'єднання дистальної частини мікроворсин або ж появи між ними. Необхідно зазначити, що везикуляція мікроворсинок – це звичайна реакція ентероцитів на зовнішні стимули, яка, можливо, є швидким механізмом виведення шкідливих агентів, які, ймовірно, фіксуються до люмінальної поверхні клітин кишківника [27]. Висновок про вивільнення CEACAM5 у нормальній товстій кишці через покриті ними мікровезикули збігається з результатами групи дослідників під керівництвом Y. Matsuoka [46]. Вони продемонстрували, що понад 90 % від загальної кількості CEACAM5 у калі існує в мембрано-зв'язаній формі та може бути виділена з цих мембран за допомогою фосфатидилінозитол-специфічної фосфоліпази C. Тотожні результати були одержані під час дослідження сироватки крові, у якій поряд із розчинними формами молекул були виявлені CEACAM1, 5 та 6 у складі мікровезикул, які, ймовірно, надходили до судин із пухлинної тканини [39].

На жаль, на сьогодні наявно дуже мало даних про поліморфізм та мутації в генах, які кодують молекули CEACAM, хоча це може відбиватися на виконуваних ними функціях [47, 48].

1.2 Регуляція активності CEACAM

Trans-олігомеризація в результаті гомофільних взаємодій між екстрацелюлярними N-доменами CEACAM на сусідніх епітеліальних клітинах є основою CEACAM-опосередкованої міжклітинної адгезії [42, 49]. Однак стало зрозуміло, що цей гомофільний (CEACAM-CEACAM) тип

сигналізації додатково підтримується наявністю С-доменів [42, 50]. Більше того, нещодавні дослідження розчинних та мембранозв'язаних ектодоменів CEACAM1 не лише підтвердили критичну роль N-домену для trans-олігомеризації, а й засвідчили додаткові cis-взаємодії в позаклітинній частині CEACAM1. Позаклітинний досить гнучкий ланцюг CEACAM1 може бути стабілізований шляхом cis-взаємодії між N- та С-доменами паралельних молекул CEACAM1 [51].

CEACAMs є багатофункціональними білками адгезії, що мають плейотропний ефект в епітелії, ендотелії та гемопоетичних клітинах. CEACAM1 та деякі інші представники сімейства CEACAM (CEACAM3, 4, 18–21), які мають трансмембранні домени, можуть передавати сигнали безпосередньо через свої цитоплазматичні домени в цитоплазму. Для цього CEACAM1 утворює гомодимери в cis-конфігурації [34]. CEACAM5–8, що мають GPI-зв'язок із клітинами, володіють більш високою бічною рухливістю в плазматичній мембрані. Але для трансдукції своїх сигналів вони повинні використовувати інші трансмембранні партнерські молекули, наприклад, такі як CEACAM1. З іншого боку, білки CEACAM, які мають GPI-зв'язки з клітинами, можуть порушувати контакт-інгібувальні ефекти CEACAM1 [52].

Зв'язування CEACAM із патогенами також опосередковується взаємодією їх із N-кінцевими (варіабельними) доменами [34]. Це індукує низку каскадних сигналів, починаючи з фосфорилування залишків тирозину в цитоплазматичному хвості трансмембранного домену CEACAM.

У людини CEACAM1 містить у своєму цитоплазматичному домені два імунорецепторні мотиви інгібування на основі тирозину (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif – ITIM), тоді як у гризунів він лише один, другий замінюється імунорецепторним мотивом перемикання на основі тирозину (immunoreceptor tyrosine-based switch motif – ITSM) [26]. Людський CEACAM3 і, ймовірно, CEACAM4, 19 та 20 несуть імунорецепторний мотив активації на основі тирозину (immunoreceptor tyrosine-based activation motif –

ITAM) у своїх цитоплазматичних хвостах. Загальноприйнятою є думка, що фосфорилування залишків тирозину в ITIM являє собою ініціативний етап передавання сигналів, опосередкованих CEACAM1. CEACAM1-L може фосфорилуватися за участі білкових тирозинкіназ родини Src, кіназою інсулінових рецепторів (insulin receptor kinase – IRK) та при стимуляції рецепторів епітеліального фактора росту (epidermal growth factor receptor – EGFR) [52,53]. Після фосфорилування CEACAM1-L може зв'язувати й активувати як білкові тирозинкінази, такі як c-src, lyn, hck, так і білкові тирозинфосфатази, такі як SHP-1 та SHP-2 [53].

Окрім CEACAM1-L, CEACAM1-S також має можливість безпосередньо індукувати передавання сигналів. Протеїнкіназа C (protein kinase C – PKC) може фосфорилувати залишки серину та треоніну як у CEACAM1-S, так і в CEACAM1-L [53]. Крім того, обидва варіанти сплайсингу взаємодіють із ДНК-полімеразою білка Poldip 38 [54], а також з актином, таліном, паксиліном та філаміном А (рис. 1.4) [53].

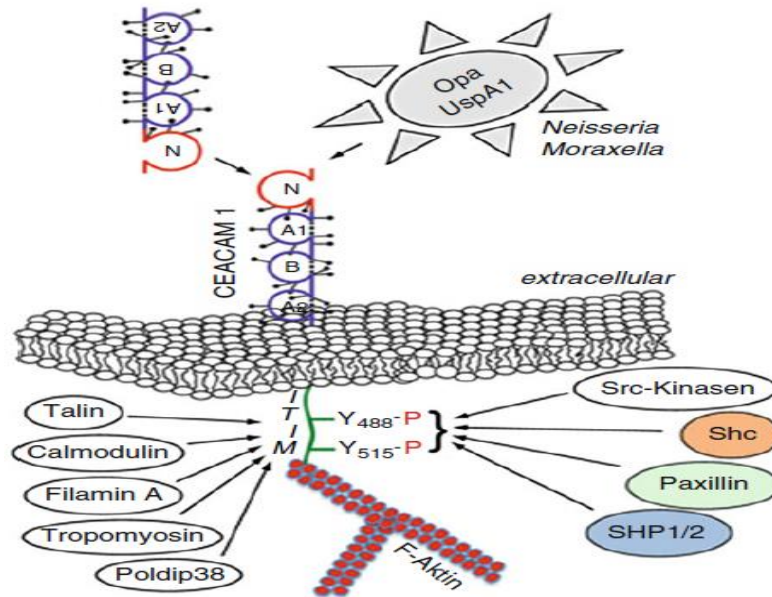


Рисунок 1.4 – Схема позаклітинних лігандів та партнерів внутрішньоклітинної взаємодії CEACAM1-L [41]

PKC-опосередковане фосфорилування CEACAM1 індукує зв'язування кальмодуліну з цитоплазматичним доменом CEACAM1 і, як результат,

регулює його *cis*-димеризацію [51]. CEACAM1 може асоціюватися в *cis*-конфігурації з інтегрином $\alpha\upsilon\beta 3$, ймовірно, для сприяння клітинної інвазії [53].

Для CEACAM1 позаклітинно існує лише декілька зв'язувальних партнерів. Натомість внутрішньоклітинно наявна значна кількість різних молекул, що можуть взаємодіяти із CEACAM1. Таким чином, стимуляція позаклітинних доменів CEACAM1 повинна бути менш вираженою, ніж вплив на цитоплазматичні її хвости

Після зв'язування з бактеріями CEACAM3 фосфорилується в ділянці ITAM домену Src-кіназою, зокрема Hck та Fgr [35], після цього патогени фагоцитуються й елімінуються. Крім того, як повідомлялося раніше, представники сімейства CEACAM, що кріпляться до мембрани клітин GPI-зв'язком, також здатні індукувати передавання сигналу. Взаємодія CEACAM8 із лігандами призводить до активації позаклітинної сигнал-регульованої кінази 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2 – Erk1/2), а надекспресія CEACAM6 спричиняє підвищення активності тирозинкінази c-Src та серин/треонін-кінази akt-1 [55, 56].

Крім того, CEACAM1, 3, 6 і 8 можуть ініціювати адгезію нейтрофілів до ендотеліальних клітин, швидше за все, шляхом активації інтегринів [53].

GPI-зв'язані CEACAMs можуть використовуватися CEACAM1 або іншими трансмембранними молекулами для ініціювання внутрішньоклітинних каскадів реакцій, хоча остаточно це явище до цього часу залишається не з'ясованим.

Упродовж останніх десятиліть декілька груп учених продемонстрували, що CEACAM1 діє як корецептор до численних клітинних рецепторів. У лімфоендотеліальних клітинах мембранозв'язаний CEACAM1 опосередковує їх проангіогенні властивості, взаємодіючи з рецепторами до судинного ендотеліального фактора росту 3 (vascular endothelial growth factor – VEGF) [53]. Це підтверджено SHP-1- та Src-залежним фосфорилуванням ITIM у цитоплазматичному домені CEACAM1-L при додаванні VEGF.

SEACAM1 також є основним корецептором до рецепторів VEGF-2, регулюючи проникність судинної стінки та ангіогенез, за рахунок активації VEGFR2-Akt-eNOS ферментативного каскаду (див. далі) [57]. Крім того, за певних обставин інсулінові рецептори (insulin receptor – IR) та EGFR здатні фосфорилювати Tyr⁴⁸⁸ в ITIM молекул SEACAM1-L.

SEACAM1 ініціює зв'язування формених елементів крові з ендотелієм за участі E-селектину [58].

У гепатоцитах експресія SEACAM1 регулюється ядерним фактором гепатоцитів 4α (hepatocyte nuclear factor 4α – HNF4α) та специфічним для печінки фактором транскрипції [59, 60]. HNF4α координує експресію білків клітинної адгезії в печінці мишей [4]. Його втрата спричиняє виражене зниження SEACAM1 і повністю нівелює експресію E-кадгерину та клаудину-1 в ембріонів [61]. У дорослих мишей при зникненні експресії HNF4α спостерігається гіперпроліферація гепатоцитів і порушений ліпідний гомеостаз у них [59, 62, 63]. Крім того, характеристика промотору SEACAM1 у щурів виявила місця зв'язування з іншими гепатоцит-специфічними факторами, такими як гепатонуклеарний фактор 5 та 1, білками активаторами 1 і 2 [60]. Крім того, SEACAM1 був описаний як «трансформаційно-чутливий білок», втрата якого свідчить про клітинну трансформацію або дедиференціювання гепатоцитів [40].

1.3 Молекулярна характеристика та експресія SEACAM у нормі

Представники SEACAM1 мають від одного до трьох C2-подібних доменів, які є продовженням термінального N-домену. Окрім позаклітинних доменів частина ізоформ має два види цитоплазматичних доменів – довгі (long – L, 71–73 амінокислоти) та короткі (short – S, 10 амінокислот) хвости, існування яких контролюється активацією та деактивацією екзона 7 відповідно. Наявність цих хвостів є регульованою подією в нормальних тканинах, що залежить як від функціонування інтронів та екзонів, так і від

експресії білків hnRNP A1 і L, а також hnRNP M [64]. CEACAM1 є сильно N-глікозилізованим білком, у якому більше ніж 60 % маси становлять вуглеводні, позитивно впливаючи на стабільність білка та період напіввиведення. Відповідно до стандартизованої номенклатури, число після CEACAM1 свідчить про кількість позаклітинних Ig-подібних доменів, тоді як літера, що йде за цим номером, засвідчує наявність довгого (L) або короткого (S) цитоплазматичного хвоста чи унікального кінця (C). Експресія L- та S-хвостів стає нерегульованою за деяких злоякісних пухлин: КРР, раку молочної залози (РМЗ) та недрібноклітинного раку легені (НДКРЛ) [65–67]. Найбільш вивченими ізоформами CEACAM1 є CEACAM1-3S, CEACAM1-4S, CEACAM1-3L і CEACAM1-4L.

Електронна томографія засвідчила, що ектодоменні структури CEACAM1 є дуже «гнучкими». Вони можуть утворювати як антипаралельні міжмембранні trans-димери (між двома клітинами), так і cis-димери (в межах однієї клітини), демонструючи міцне паралельне з'єднання всіх чотирьох константних доменів і навіть варіабельного домену [51].

CEACAM1-L найбільш відомий своїми двома цитозольними залишками фосфотирозину та ІТІМ, залученими до передавання інгібувальних сигналів під час взаємодії з лігандами та корецепторами (рис. 1.5).

Фосфорилування тирозину (Tyr⁴⁸⁸ і Tyr⁵¹⁵) в ІТІМ CEACAM1-L сприяє приєднанню та активації домену гомології-2 src (Src homology 2 – SH2), які входять до складу Src-кіназ та SH2-вмісних тирозинфосфатаз 1 та 2 (SH2 containing tyrosine phosphatases – SHP) [26, 68].

У стані мономеризації та гомодимеризації ферменти мають різну спорідненість до ІТІМ інтрацитоплазматичного «хвоста» CEACAM1-L. У стані мономера ІТІМ приєднує та активує SHP-1, SHP-2 та Src-кінази [69]. Гомодимеризація CEACAM1-L відображається на спорідненостях зв'язування SHP-2 та Src-кіназ – посиленні зв'язування/активації SHP-2 та інертності чи зниженні зв'язування/активації Src-кіназ. Водночас SHP-1 є недоступним для зв'язування з димерним CEACAM1-L (рис. 1.6) [69, 70].

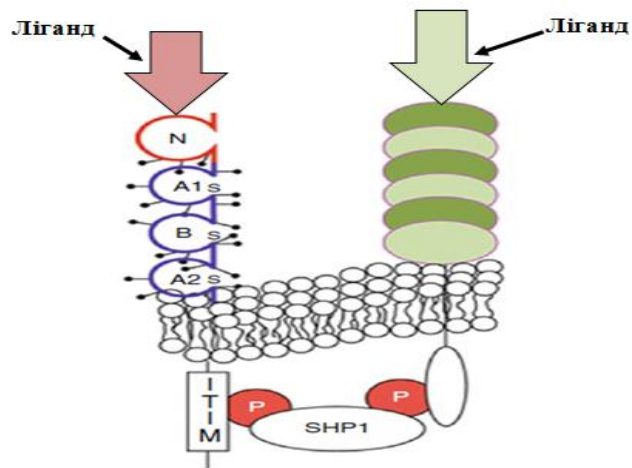


Рисунок 1.5 – Початкові стадії передавання сигналів, опосередкованих CEASAM1-L [41]. Зв'язування CEASAM1-L із лігандом викликає фосфорилування тирозину в межах його цитоплазматичного домену ITIM та залучення SHP-1. Згодом CEASAM1 може взаємодіяти через SHP-1 з іншими молекулами і модулювати їх сигнальну здатність, впливати на функціонування клітин

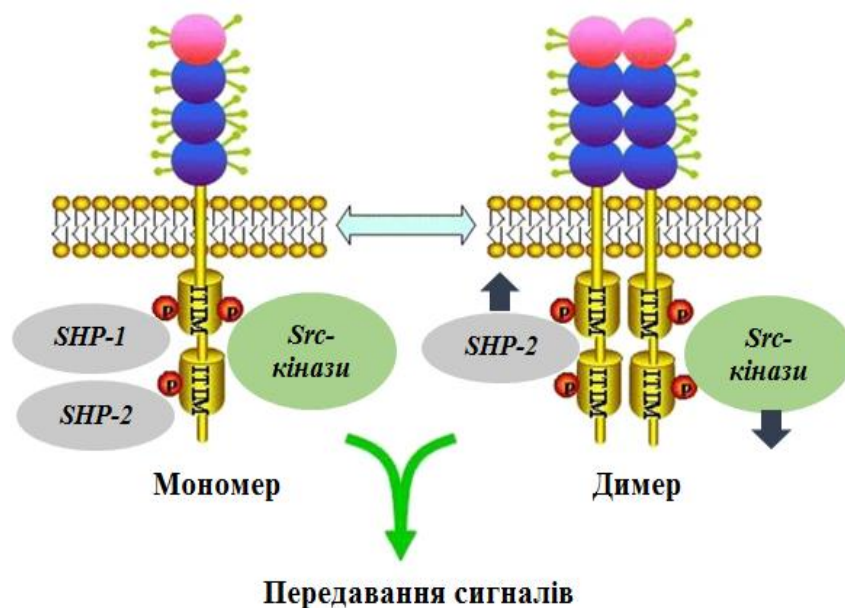


Рисунок 1.6 – Особливості трансдукції сигналів через CEASAM1-L у стані мономера та гомодимеру [70]

CASAM1-S може втручатися у функціонування CEASAM1-L, швидше за все, через *cis*-димеризацію (утворення CEASAM1-L-1-S-димерів) [34]. Той

факт, що CEACAM1 може димеризуватися в *cis*-формі (L/L, L/S і S/S), робить ці білки ще більш складними для вивчення та встановлення їх функціональних ефектів [51, 69].

Група вчених під керівництвом В. Obrink показала, що *trans*-гомофільне зв'язування, опосередковане N-доменом, індукує *cis*-димеризацію CEACAM1. *Cis*-гомодимеризація CEACAM1-L (L/L) зв'язує його цитоплазматичні домени, тим самим змінюючи відносну афінність їх до SHP-1/2 та c-Src. Це супроводжується посиленням зв'язування та активації SHP-1/2. CEACAM1-S може перешкоджати цьому процесу, утворюючи гетеродимери із CEACAM1-L, тим самим знижуючи рівень конфігурації цитоплазматичного димеру CEACAM1-L [52, 71]. Отже, співвідношення між CEACAM1-L та CEACAM1-S (співвідношення CEACAM1-L/S) та їх коекспресія з іншими представниками сімейства CEACAM можуть бути визначальними компонентами функціональної активності клітин, опосередкованих CEACAM1 [52].

CEACAM1-S може зв'язуватися фосфорильованим залишком серину з кальмодуліном, тропоміозином, глобулярним актином, анексином II та білком PDIP38 (DNA polymerase delta interacting protein), а також бути фосфорильованим різними протеїнкіназами для регулювання цитоскелетної динаміки [72, 73].

З 12 різних ізоформ CEACAM1 три (CEACAM1-4C1, -3, -3C2) є секреторними (розчинними) формами, відіграючи значну роль у пригніченні міжклітинної адгезії, особливо у пацієнтів із дефіцитом TAP2 та обтураційною жовтяницею, які мають велику кількість секреторних CEACAM1 (secreted CEACAM1 – sCEACAM1) у сироватці крові [74, 75]. У нормі його рівень у плазмі крові становить у середньому 48,5 нг/мл зі зниженням цього показника під час вагітності [76]. Важливо зазначити, що варіабельність sCEACAM1 є маркером розвитку багатьох злоякісних пухлин [77–79].

Тканини людського організму відрізняються не лише наявністю або відсутністю цих білків у їх складі, а й співвідношенням SEACAM1-L/S [55, 65, 80, 81]. Дві ізоформи SEACAM1 зазвичай співіснують у багатьох нормальних тканинах, причому довша ізоформа зазвичай наявна в менших кількостях, ніж коротша. Наприклад, у колоноцитах SEACAM1-L становить лише 15–20 % від загальної кількості SEACAM1. Установлено, що в нормі тканини кишківника, печінки, легень та простати коекспресують SEACAM1-L та SEACAM1-S. Водночас печінка і простата експресують більше SEACAM1-S, а легені – SEACAM1-L. На противагу цьому тканини мозку, серця та нирок експресують майже виключно SEACAM1-L [66]. SEACAM1-L демонструє інгібуючий фенотип щодо пухлинного росту за його експресії у фізіологічних концентраціях та у відповідному співвідношенні щодо SEACAM1-S. Однак надекспресія SEACAM1-S або порушення нормального співвідношення SEACAM1-L/S нівелюють гальмівний потенціал SEACAM1-L. Відповідно відносний рівень експресії різних ізоформ визначає результат клітинної сигналізації [80, 81]. Наявність SEACAM1-S та SEACAM1-L є індикатором різних функціональних ефектів цих білків (як мономерів) та їх гомо- і гетеродимерних комплексів у *cis*- та *trans*-конфігураціях [33, 51, 65, 82].

SEACAM1 – це найбільше поширений представник сімейства SEA, описаний у різних епітеліальних клітинах, в ендотеліальних клітинах дрібних новоутворених судин [53], а також у лімфоїдних та мієлоїдних клітинах [16, 27]. У нормальному епітелії експресія SEACAM1-L спостерігається на апікальній та бічній поверхнях клітин. Локалізація SEACAM1-L на бічній поверхні епітелію вимагає експресії Tug⁵¹⁵ у межах його цитоплазматичного домену, а фосфорилування Tug спричиняє його швидке PI3K-залежне переміщення до ендосом/лізосом [83]. SEACAM1-S наявний лише на апікальному полюсі клітин [84].

За допомогою досліджень печінки плодів у щурів доведено, що експресія SEACAM1 виникає у гепатоцитах на 16-й день після гестації [85]. У мишей

SEASAM1 виявляється в кишківнику вже на 10,5-й день після гестації [86] і постійно зростає до 3-го тижня після народження, досягаючи рівня його експресії в печінці [85]. Необхідно зазначити, що експресія обох ізоформ SEASAM1 (SEASAM1-S та -L) у гепатоцитах також збільшується після народження, що свідчить про їх участь у диференціюванні клітин. Ця гіпотеза підтверджується результатами вивчення регенеруючої печінки після часткової гепатектомії в щурів – зниження експресії SEASAM1 на поверхні гепатоцитів на піку проліферації клітин та відновлення рівня їх експресії після завершення регенерації на 15-й день після гепатектомії [85, 87, 88]. Ця модель є індикатором не лише участі SEASAM1 у диференціюванні гепатоцитів, а й демонструє їх залежність (або залежність проліферації від SEASAM1) від проліферативної активності клітин.

Експресію SEASAM1 виявлено в епітеліальних клітинах стравоходу (слизові залози), шлунка (клітини слизової оболонки пілоричного відділу), 12-палої кишки (брунерові залози та епітеліальні клітини), порожньої і клубової кишок (епітеліальні клітини), товстої кишки (циліндричний епітелій та келихоподібні клітини), підшлункової залози (епітеліальні клітини великих і малих проток), печінки (на повернутій до жовчних капілярів поверхні гепатоцитів та жовчних протоках), жовчного міхура (епітеліальні клітини), нирок (епітелій проксимальних каналців), сечового міхура (перехідний епітелій), передміхурової залози (залозистий епітелій), шийки матки (багатошаровий плоский епітелій), тіла матки (епітелій ендометрія та ендоцервіксу), молочної залози (епітелій проток), клітин потових і сальних залоз шкіри [42,89]. Експресія SEASAM1 наявна в клітинах трофобласта та кісткового мозку (попередники гранулоцитопоезу та моноцитопоезу) [16]. Натомість SEASAM1 не виявлено в міоцитах, хондроцитах та адіпоцитах [90].

Експресія SEASAM1 ендотеліальними клітинами є індикатором їх участі як у васкулогенезі в ембріональному періоді, так і в ангиогенезі й функціонуванні судин за умов існування організму та різних патологічних

станів [91]. У нормі CEACAM1 експресується ендотелієм артерій, вен та капілярів плаценти, капілярів клубочків і прямих артеріол нирок, синусоїдів наднирникових залоз, малих судин ендометрія, панкреатичних ендокринних острівців, простати та активних ділянок щитоподібної залози [16]. Відзначено, що ангіогенно-активовані ендотеліальні клітини малих кровоносних судин мають значно нижчі рівні експресії CEACAM1 порівняно з ангіогенно-активованими лімфоендотеліальними клітинами [53].

Вони опосередковують міжклітинну адгезію шляхом гомофільних (CEACAM1-CEACAM1) та гетерофільних (CEACAM1-CEACAM5, CEACAM1-CEACAM6 і CEACAM1-CEACAM8) взаємодій [49, 58, 92, 93].

Серед лейкоцитів надекспресію CEACAM1 виявлено в активованих гранулоцитах, В- і Т-лімфоцитах. Крім того, в людини CEACAM1 представлені різним (специфічним для кожної типу клітин) рівнем глікозилювання варіабельних та константних доменів, що впливає на їх молекулярну масу приблизно від 120 кДа до 160 кДа в епітеліальних клітинах і гранулоцитах відповідно [53].

Один із «функціональних принципів» CEACAM1 полягає в тому, що вони рідко самостійно виконують якусь із функцій. Здебільшого ці білки впливають на активність інших молекул.

1.4 Функції CEACAM

CEACAM1 має низку функціональних тригерних механізмів впливу, беручи участь у різних фізіологічних та патофізіологічних процесах і регулюючи клітинну контакт-залежну трансдукцію сигналів (рис. 1.7).

1.5 Використання CEACAM в імунотерапії та діагностиці

Дослідження *in vitro* та *in vivo* на ксенотрансплантатах меланоми засвідчують, що анти-CEACAM1 (мишачі IgG1-моноклональні антитіла

проти людини) mAbs, таргетні до позаклітинного домену CEACAM1, блокують N-домени CEACAM1 у неопластичних клітинах, полегшуючи елімінацію меланомних клітин Т-лімфоцитами та не впливаючи на швидкість їх проліферації.

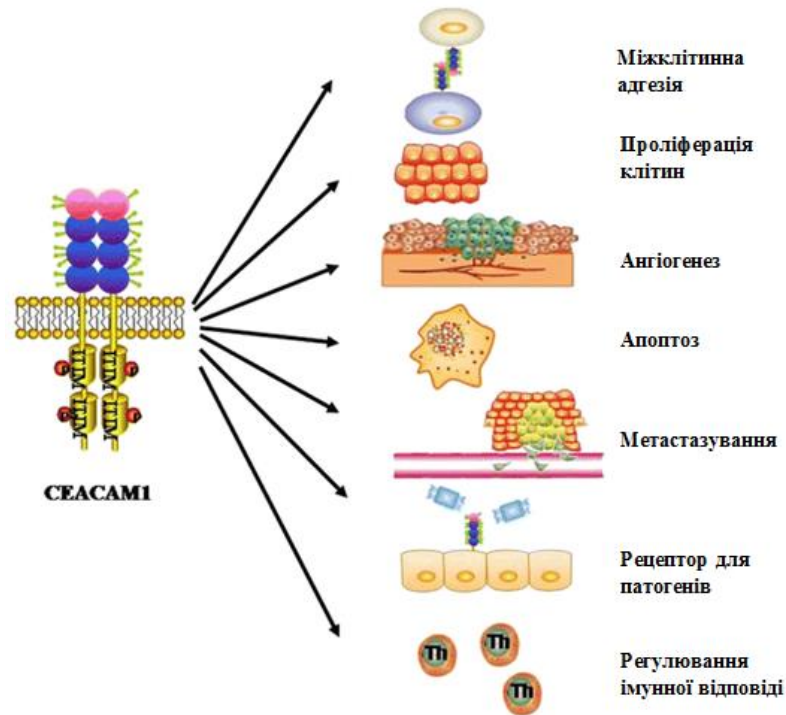


Рисунок 1.7 – Процеси, в яких CEACAM1 бере участь [70]

Терапія антитілами MRG1 не впливає на нормальні епітеліальні клітини, що експресують CEACAM1 та не призводить до ініціювання аутоімунних реакцій за рахунок активованих Т-лімфоцитів [48]. Вважається, що цілеспрямоване блокування рецепторів CEACAM1 із використанням адаптованих транспортерів може покращити лікування CEACAM1-позитивних пухлин [94]. Нові специфічні mAbs при імунотерапії меланоми, що базуються на функціональному блокуванні CEACAM1, навіть тепер є доступними [95, 96]. Випробування першої фази (NCT02346955) триває у двох медичних центрах США та одному центрі Ізраїлю [97]. За рахунок пригнічення CEACAM1-рецепторів очікується активація НК-клітин та Т-лімфоцитів із посиленням їх протипухлинного ефекту.

СЕАСАМ1 має спільні механізми сигналізації за участі СТЛА-4 та рецепторів запрограмованої загибелі клітин 1 (programmed death 1 – PD-1), виявляючи інгібіторні ко-рецепторні властивості стосовно до Т-лімфоцитів [98,99]. Зважаючи на те, що СЕАСАМ1 інгібує проліферацію й цитотоксичну активність Т- та НК-клітин, а також ураховуючи імуносупресивний ефект експресії СЕАСАМ1 на клітини меланоми, дуже актуальним напрямом сучасної імунотерапії є використання високоафінних антитіл до N-домену СЕАСАМ1 (MRG1). Це робить пухлинні клітини більш уразливими до імунних атак Т-клітинами, посилюючи протипухлинний кілінг інших ефекторних лімфоцитів [95].

Окрім меланоми, інші пухлини, що експресують СЕАСАМ1 (KPP), також можуть бути мішенню до анти-СЕАСАМ1-специфічної терапії, посилюючи антитілозалежну клітинно-опосередковану та комплемент-залежну цитотоксичність [100]. Миші, в яких змодельовано СЕАСАМ1-позитивний KPP із метастазами в легені, були більш чутливими до анти-СЕАСАМ1-терапії mAbs (WL5), ніж до лікування адриаміцином. У них не виявлено метастазів порівняно з тими, яким вводили хіміотерапевтичний препарат [100]. Інше анти-СЕАСАМ5 антитіло (CC4) взаємодіє між СЕАСАМ5 на поверхні епітеліальних клітин KPP та НК-специфічними СЕАСАМ1, посилюючи тим самим цитотоксичність НК-клітин щодо пухлини [101].

Антитіла, що стимулюють СЕАСАМ1, індукують зміни форми білків-інтегринів, тоді як СЕАСАМ1-інгібіторні антитіла зменшують зв'язування з лігандами [69, 102]. Такі анти-СЕАСАМ1 mAbs можуть бути потужним інструментом у регулюванні функцій, залежних від СЕАСАМ1.

Окремим перспективним напрямком терапії є використання екзогенного СЕАСАМ1, що доставляється до органів, де його експресія була пригнічена за патологічних умов [103, 104]. Так, при виразковому коліті відбувається виражене пригнічення СЕАСАМ1 порівняно з інтактним кишківником, яке нівелюється доставленням екзогенного СЕАСАМ1 до уражених відділів кишківника. Більше того, це супроводжується зменшенням клінічної

симптоматики захворювання, а також зменшенням запальної відповіді, Т-лімфоцитарної інфільтрації та апоптозу колоноцитів [104].

Попередні дослідження успішно продемонстрували перспективність використання CEACAM1 mAb, з'єднаних з флуоресцентною міткою, в мишей для візуалізації пухлин підшлункової залози та КРР [105, 106], а також їх мікрометастазів [107]. Удосконалення цієї методики було проведено шляхом використання 6G5j-антитіл, що містять коктейль анти-CEACAM-антитіл (проти людських CEACAM1, 3, 5, 6 та 8) [108]. Це дозволяє візуалізувати не лише CEACAM1-позитивні неопластичні клітини, а й ті, які експресують інші рецептори (CEACAM5 або 6) при CEACAM1-негативному їх профілі. Висловлюються великі сподівання на можливість використання детекції пухлинних клітин в інтраопераційній практиці з метою повного видалення як первинних вогнищ (візуалізація «негативних країв»), так і всіх метастатичних уражень лімфатичних вузлів [108].

Підсумовуючи вищезазначене, можна припустити, що імунотерапія та діагностичні дослідження з використанням анти-CEACAM1 mAbs та нативних CEACAM1 можуть бути дуже перспективними напрямками запровадження в практичну медичну діяльність, хоча клінічні випробування ще тривають.

1.6 Експресія CEACAM у пухлинах органів репродуктивної системи

У пухлинній тканині експресія CEACAM1 дуже динамічна – спостерігається їх зниження на ранніх фазах багатьох злоякісних новоутворень, включаючи рак товстої кишки [109], простати [110], печінки [111], молочної залози [112], сечового міхура [79], нирок [16] та матки [113]. Більше того, таке їх зменшення в епітеліальних клітинах є ранньою ознакою під час прогресування захворювань, оскільки це явище починає відбуватися ще при гіперпластичних ураженнях цих органів [110]. Введення різних ізоформ CEACAM1 у культури клітин КРР та карциноми

простати продемонструвало важливість експресії CEACAM1-L для підтримання нормального фенотипу клітин із пригніченням розвитку пухлини у сингенних або імунодефіцитних мишей [114]. Також встановлено, що експресія CEACAM1-L *in vitro* в клітинах аденокарциноми легень (A549) інгібує проліферативну активність клітин ITIM-опосередкованим шляхом [52]. Ці результати свідчили про супресивний ефект CEACAM1 щодо пухлинного розвитку.

У деяких злоякісних пухлинах молочної залози [115] та кишківника [116] спостерігається збільшення експресії CEACAM1.

Однак гіперекспресія CEACAM1 та/або виникнення експресії у CEACAM1-негативних тканин за деяких типів агресивних пухлин, таких як меланома [117], НДКРЛ (плоскоклітинний, аденогенний) [118], рак шлунка [119], щитоподібної залози, яєчників [120], пухлини ротової порожнини та слинних залоз [121], рак стравоходу та підшлункової залози [78], свідчило про, навпаки, модулюючий ефект CEACAM1-L щодо метастатичного поширення та гіршого прогнозу цих новоутворень. Зокрема, проведені дослідження показали не лише важливість коливання кількості CEACAM1 у пухлинній тканині, а й співвідношення CEACAM1-L/S. Зростання цього показника було пов'язане із залученням лімфатичних вузлів, гематогенними метастазами, гіршим прогнозом та меншою виживаністю пацієнтів, переосмислюючи роль CEACAM1 у прогресуванні злоякісних пухлин [32, 117]. Досліджуючи різні клітинні пухлинні лінії, встановлено, що клітини злоякісної гліоми більше експресують CEACAM1-L, клітини раку товстої кишки – CEACAM1-S. Клітини раку передміхурової та молочної залоз мають варіабельну експресію CEACAM1-L та CEACAM1-S. Співвідношення CEACAM1-L/S здебільшого є відмінним від показників нормальних клітин цих органів [66].

Необхідно зазначити, що в деяких дослідженнях не виявлено коливання рівня CEACAM1 у карциномах молочної залози [122] та легень [123].

До регуляції експресії гена *Seacam1* залучені пухлино-супресивні білки p53, що відображається на взаємодії SEACAM1 з різними представниками сімейства інтегринів, кіназою місцевої адгезії (focal adhesion kinase – ФАК) та паксиліном. Описані також прометастатичні властивості SEACAM1 – за їх експресії пухлинними клітинами карциноми набувають більшої здатності поширюватися по організму [117].

Однією з причин різнобічної експресії та функціональної ролі SEACAM1 можуть бути зміни співвідношення SEACAM1-L/S, які, як було показано, відрізняються між непроліферуючими та проліферуючими епітеліальними клітинами [52, 71]. Крім того, виявлено вплив варіабельності співвідношення SEACAM1-L/S на зростання та метастазування НДКРЛ.

Висловлюється також припущення про синтез неопластичними клітинами специфічних факторів, які індукують експресію ендотеліальними клітинами кровоносних та лімфатичних судин значну кількість SEACAM1.

Далі наведені відомості про участь SEACAM1 у перебігу онкологічних процесів в окремих органах. Частково приділяється увага їх впливу та варіабельності в непухлинних захворюваннях.

1.6.1 Молочна залоза

У клітинних лініях молочної залози встановлена участь SEACAM1-S у поляризації клітин та формуванні просвітів ацинусів за рахунок активації аноїкізу [72, 124–126]. Це відбувається як через вах-опосередкований вихід цитохрому С із мітохондрій у цитоплазму клітин та активацію внутрішнього шляху апоптозу [125], так і через інші (зокрема, каспазні) сигнальні шляхи. Інші ж дослідження демонструють участь саме SEACAM1-L у формуванні просвітів ацинусів [127].

У нормі SEACAM1 експресується на апікальній поверхні протокового та залозистого епітелію молочної залози людини [112,113]. Відсутність у латеральних та базальних полюсах не виключає участі SEACAM1 в адгезії

клітин у зв'язку з можливим маскуванням їх епітопів у нормальній тканині молочної залози та появі (візуалізації) в разі дисоціації клітин у неопластично-трансформованій тканині [16]. Установлено наявність CEACAM1 на поверхні секретованих люмінальними клітинами везикулах і, як очікувалось, у складі грудного молока [126]. Було зроблено припущення про їх участь в адгезії ліпидовмісних везикул до ентероцитів дітей, яких вигодовують грудним молоком [126]. Міоепітеліальні клітини іноді мають сильну або помірну мембранну експресію CEACAM1. Гранулоцити є завжди позитивними у тканині молочної залози, натомість судини та апокриновий епітелій – негативними.

Фіброзно-кістозна хвороба, внутрішньопотокова та долькова гіперплазія (проста та атипова) характеризуються збереженням експресії CEACAM1 на апікальній поверхні люмінальних клітин та частково в міоепітеліоцитах [126]. У дослідженні Q. Liu та ін. виявлено цитоплазматичну експресію CEACAM1 в атиповій протоковій гіперплазії, яка одночасно спостерігалася з апікальною експресією на периферії проліфератів [127]. Протокова та долькова карциноми *in situ* характеризуються зміною апікальної експресії на суцільну мембранну [127] та цитоплазматичну [128] під час дедиференціювання пухлин.

У пацієнтів із різними формами РМЗ спостерігається статистично вищі показники sCEACAM1 у плазмі крові (у середньому 532 нг/мл), порівняно з жінками, які або не мають патології молочної залози (у середньому 330 нг/мл), або хворіють на доброякісні захворювання (у середньому 423 нг/мл) [129]. Крім того, за наявності доброякісних пухлин рівень sCEACAM1 у крові був також статистично вищим за показники здорових жінок. Тому було запропоновано використовувати визначення sCEACAM1 у плазмі крові як специфічний та чутливий маркер пухлинної патології молочної залози, надійність якого була вищою за показники CA15-3 та CEA у плазмі крові [129]. Необхідно зазначити, що значно вищі показники sCEACAM1 було виявлено в РМЗ за відсутності естрогенових рецепторів (Estrogen

receptors – ER) у неопластичних клітинах. Концентрація їх у крові не залежала від віку хворих, розмірів, гістологічного варіанта та ступеня диференціювання пухлин, наявності метастазів, експресії рецепторів до прогестерону (Progesterone receptor – PR), рецепторів другого типу людського епідермального фактора росту (Human epidermal growth factor receptor-2 – Her2/neu) та проліферативної активності пухлинних клітин.

Позитивну експресію CEACAM1 у тканині РМЗ згідно з різними дослідженнями виявлено у 79 %, 56 %, 80 %, 77 %, 73 %, 81 % та 100 % випадків.

У високодиференційованих карциномах експресія CEACAM1 залишається на апікальному полюсі клітин з одночасним її зменшенням та зникненням в окремих ділянках пухлини. У дедиференційованій неопластичній тканині виявляються вогнища з мембранною експресією CEACAM1 на всій поверхні клітин [127], а також цитоплазматична їх локалізація [112,127]. Рівень експресії CEACAM1 в оточуючій інтактній тканині у переважній кількості випадків (65 %) був більший, ніж у пухлинній тканині [112,115], хоча і виявляли випадки як з такою самою кількістю CEACAM1 (28,3 %), так і з меншою їх кількістю (6,6 %) [115].

Дослідження клітинних ліній РМЗ (BT-549, Hs 578T, T-47D, MCF7, MDA-MB-231 та MDA-MB-468) за допомогою ELISA показало їх майже удвічі нижчу здатність до синтезу sCEACAM1 порівняно з нормальними клітинами молочної залози (MCF 10A) [112]. У цьому самому дослідженні за допомогою флуоресцентної мікроскопії виявлено, що клітини РМЗ більш ніж удвічі менше експресували мембранозв'язані CEACAM1, аніж клітини MCF 10A. Отже, дерегульованість CEACAM1 у неопластичних клітинах була підтверджена на мРНК та білковому рівнях – пухлинні клітини мали на 10–20 % меншу кількість мРНК CEACAM1 та більше ніж удвічі меншу кількість білка CEACAM1, визначеного за допомогою вестерн-блотингу [115]. Усі ці дослідження сприяли висловлюванню думки про дерегулювання (зниження)

CEACAM1 у разі злоякісної трансформації в молочній залозі, яке було підтверджено на всіх рівнях, та їх антипухлинний (протективний) вплив.

Деякі дослідження взагалі не виявили різниці в експресії CEACAM1 між нормальною та пухлинною тканиною молочної залози [122]. Незміна кількість CEACAM1 спостерігається під час пухлинного росту в молочній залозі. Ключовим моментом є якісні особливості їх дестрибуції у неопластичних клітинах – експресія CEACAM1 на всій поверхні та в цитоплазмі клітин є ознакою злоякісного пухлинного росту.

У жінок із метастатичним ураженням лімфатичних вузлів виявлено нижчі рівні експресії CEACAM1 у неопластичній тканині. Випадки інвазивного протокового РМЗ мали меншу експресію CEACAM1 у пухлинній тканині, порівняно з муцинозними, тубулярними та дольковими карциномами [130]. Не виявлено взаємозв'язку між CEACAM1 та іншими клінічними й морфологічними параметрами (диференціюванням і розміром пухлин, віком, експресією ER, PR, HER2, циклін D1, циклін E, p16, p21 та Ki-67) [130]. Незважаючи на це, наявні дані про відсутність взаємозв'язку між CEACAM1 та метастазами у лімфатичні вузли і диференціюванням карцином, і, навпаки, наявність позитивної кореляції між CEACAM1 та ER/PR і виживаністю пацієнтів [115].

Спостерігалася прямопропорційна кореляція між рівнем експресії CEACAM1 (виявленим за допомогою вестерн-блотингу та імуногістохімічно в пухлинній тканині) та експресіями двох пухлино-супресивних генів ретинобластоми Rb та Rb2, а також CDK- (cyclin-dependent kinase) інгібіторами p27, що регулюють клітинний цикл. Основний механізм участі CEACAM1 у регуляції активності Rb та Rb2 полягає в залученні різних посередників трансдукції сигналів, таких як v-src та ядерна тирозинкіназа Rak [131].

Під час дослідження експресії Id-1 та CEACAM1 у нормальній, передпухлинній та карциноматозній тканині молочної залози виявлено їх чіткий взаємозв'язок – транслокація CEACAM1 з апікальної поверхні на весь периметр пухлинних клітин та в цитоплазму є наслідком посиленої експресії

Id-1, яка виникає в разі злоякісної трансформації та прогресуванні РМЗ [127]. Враховуючи участь Id-1 у регуляції клітинного циклу [128], не виключається роль CEACAM1 у регуляції проліферативної активності клітин через інгібування диференціювання клітин та синтезу ДНК.

Відмінності одержаних результатів можуть бути пов'язані з популяційними особливостями пацієнтів, різному стані довілля, а також чутливістю і специфічністю використаних маркерів [112].

Виявлено істотно нижчу експресію мРНК CEACAM1-4S у високометастатичних клітинах РМЗ (Hs578T, BT549 та MDA-MB-231) порівняно з мінімально метастазуючими клітинними лініями (MDA-MB-468 і T47D), а також неінвазивними клітинами (MCF10A) молочної залози. Більше того ініціювання експресії CEACAM1-4S шляхом CEACAM1-4S-трансфекції знижує метастатичний та інвазивний потенціал клітин РМЗ. CEACAM1-4S-трансфектні клітини (Hs578T та BT549) з модульованою експресією CEACAM1-4S мали підвищений рівень експресії тканинних інгібіторів MMP2 (tissue inhibitor of MMP – TIMP) та знижений рівень MMP2, що свідчить про виняткову їх участь (а не MMP9/TIMP1) у поширенні злоякісних пухлин молочної залози. З іншого боку, ініційована надекспресія CEACAM1-4S супроводжується посиленням експресії E-кадгерину та зниженням N-кадгерину, а також модуляцією епітеліально-мезенхімальної трансформації клітин РМЗ [130]. Всупереч цьому менш агресивні клітинні лінії РМЗ (MCF7) показали меншу експресію CEACAM1-4S порівняно з більш агресивними неопластичними клітинами, що свідчить про незалежність поширення карцином від CEACAM1-4S-статусу новоутворень.

Виявлено незначний вплив CEACAM1-4S на проліферативну активність клітин РМЗ [130]. Більше того, вивчення експресії CEACAM1-S та CEACAM1-L у клітинах РМЗ і нормальних клітинах молочної залози показало зростання рівня CEACAM1-L у неопластичних клітинах та зменшення співвідношення CEACAM-S/L до 1–7,8 (у нормі воно становить 15–16) [66]. Коливання їх співвідношення також може бути причиною

порушення поляризації епітеліальних клітин, одного з маркерів неопластичного процесу [66].

Експресія CEACAM1-4S у клітинах РМЗ повертає нормальне диференціювання клітин молочної залози та нівелює їх злоякісний фенотип.

Під час дослідження пухлинних клітин молочної залози G-2, які містять як епітеліальні, так і мезенхімальні субпопуляції клітин, встановлено, що експресія CEACAM1 властива виключно епітеліальним клітинам [131]. Клітинні лінії РМЗ (G-2) з надекспресією CEACAM1 мали більшу кількість РНК E-кадгерину та менший рівень експресії генів, які є маркерами мезенхімального фенотипу клітин (Snail, віментин, Twist1, Twist2, Tgfb1i1 та Wisp1). У цьому дослідженні виявлено спільну локалізацію та взаємодію CEACAM1 з β -катеніном за відсутності взаємодії з E-кадгеріном. Пригнічення CEACAM1 супроводжується фосфорилуванням β -катеніну та його транслокацією в ядро, результатом чого є зменшення епітеліальної субпопуляції серед клітин G-2. Це є індикатором участі CEACAM1 у підтриманні епітеліального фенотипу клітин та протидії епітеліально-мезенхімальній трансформації [131].

Наявність мутантного p53 у пухлинних клітинах РМЗ підвищує агресивність пухлинних клітин та супроводжується наростанням епітеліально-мезенхімальної їх трансформації та зниженням експресії CEACAM1.

1.6.2 Матка

Шийка матки. Виявлено експресію CEACAM1 та CEACAM5 у поверхневих шарах ектоцервіксу в ділянці ендо-ектоцервікального переходу з подальшою експресією лише CEACAM5 у поверхневих та середніх шарах ектоцервіксу. Лише в одному випадку виявлено слабку експресію CEACAM6 у клітинах ектоцервіксу [132].

У дослідженні участі експресії пан-CD66 (сюди ж входять і молекули CEACAM) разом із білками Notch1 у випадку плоскоклітинного раку шийки матки встановлено їх модулюючий ефект на інвазивність та метастатичність пухлин у лімфатичні вузли [277]. Мебраноцитоплазматична експресія CD66 (згідно з рисунками першоджерела) виявлена в неопластичних клітинах первинного вогнища, внутрішньосудинних метастазуючих клітинах та ракових клітинах у вторинних вогнищах у лімфатичних вузлах. Необхідно зазначити, що в шийці матці експресія білків CD66 та Notch1 була менш вираженою, ніж у метастатичних вогнищах [133]. За рахунок взаємодії з Notch1-опосередкованою трансдукцією сигналів CD66 активує проліферативну активність клітин та блокує їх апоптоз [133].

CD66-позитивні пухлинні клітини шийки матки мають більшу експресію генів колагеназної активності (Mmp), генів стовбурових клітин (Nanog, Oct4) та генів, що відповідають за транспортування лікарських засобів (Abcc3) [133].

Ендометрій. CEACAM1 експресуються на апікальній поверхні покривного та залозистого епітелію ендометрія незалежно від фази менструального циклу [16, 113] та циліндричному епітелію ендоцервіксу [16, 134]. Вони відсутні у стромальних клітинах ендометрія [113, 134], хоча й трапляються у складі тканинних лейкоцитів [134].

Під час фази секреції клітини ендометрія, які втрачають поляризацію та зв'язок з іншими залозистими клітинами, мають додатково експресію CEACAM1 по всій їх поверхні [113]. Неохідно зазначити, що у щурів експресія C-CAM-105 (аналог людського CEACAM1) виявлена в тих самих структурах ендометрія, хоча особливості їх маніфестації залежать від фази естрального циклу та гормонального фону тварин – естрогени стимулюють їх експресію на апікальній поверхні покривного епітелію, прогестерони – залозистого епітелію [135]. Їх було виявлено в епітеліальних клітинах та дрібних судинах ендометрія під час вагітності за відсутності в децидуальних клітинах. CEACAM1 надекспресовані екстравільозним (проміжним)

цитотрофобластом у місці імплантації ембріонів, а також екстравільозними клітинами трофобласта з інвазивним фенотипом у первинній культурі клітин. У зв'язку з цим вони можуть брати участь у посередницьких взаємодіях між трофобластом та ендометрієм.

Неохідно зазначити, що, крім CEACAM1, ендометріальні клітини є в основному CEACAM-негативними – лише в одному випадку виявлено слабку фокусну експресію CEACAM5 у залозистих клітинах ендометрія [134].

За простої та комплексної гіперплазії ендометрія експресію CEACAM1 різної інтенсивності виявлено на апікальній поверхні у всіх випадках [137].

У 97,5 % випадків ендометріюїдних та 87,5 % світло-клітинних аденокарцином виявлено експресію CEACAM1, яка була меншою за інтенсивністю ніж у нормальному ендометрії. У високодиференційованих пухлинах спостерігається апікальна експресія цих рецепторів у клітинах, які формують залозистоїдні утворення. У міру дедиференціювання карцином відбувається втрата експресії CEACAM1 або переміщення їх експресії на всій поверхні неопластичних клітин [137, 306]. Установлено ко-експресію CEACAM1 та OPN в усіх випадках інтактного ендометрія та 86 % ендометріальних карцином [113,137]. В. Julianne та ін. продемонстрували, що OPN ко-локалізується з CEACAM1 в екстравільозному трофобласті плаценти людини і посилює інвазію плацентарних клітин, що експресують CEACAM1 [36]. Коекспресія цих двох глікопротеїнів виявлена також у разі трофобласних захворювань (міхуровому занеску та хоріонепітеліомі). Передбачається, що CEACAM1 та OPN спільно функціонують у комплексі з інтегрином $\beta 3$, посилюючи інвазивність як трофобласта під час вагітності, так і пухлинних клітин у разі ендометріальних карцином [36, 137].

Аналізуючи вищезазначене, можна стверджувати, що відомості про участь CEACAM1 у канцерогенезі ендометрія мають багато суперечностей. З одного боку, вони володіють супресорним механізмом у розвитку неоплазій, дерегулюючись у разі прогресування ендометріальних пухлин [113]. З іншого

боку, їх коекспресія з прогностично несприятливими білками свідчить про їх модулюючу роль у розвитку злоякісних пухлин у тілі матки [137].

Використовуючи клітинні лінії раку ендометрія людини Hec1В, було встановлено, що стимуляція клітин естрадіолом, медроксипрогестероном та антагоністами прогестерону RU486 не супроводжується змінами експресії мРНК CEACAM1. Це свідчить про незалежність регуляції цих білків від впливів естрогену та прогестерону. Також не виявлено ефекту від стимуляції клітин Hec1В за допомогою інтерферону- γ та TNF- α , які у клітинах раку товстого кишківника посилювали синтез CEACAM1, 5 та 6. Натомість виражена індукція експресії CEACAM1 була спровокована додаванням до клітин раку ендометрія 12-О-тетрадеканоїлфорбол-13-ацетату (12-O-tetradecano-ylphorbol-13-acetate – ТРА) та іонофору кальцію A23187. Індукція CEACAM1 у цьому разі відбувається РКС-опосередкованим сигнальним шляхом [138].

Використовуючи трансгенні лінії мишей, що експресують людські CEACAM1, 3, 5 та 6, встановлено їх участь у гонококовому інфікуванні жіночих статевих органів [134]. Гонококові білки Ора можуть зв'язуватися з вищезазначеними представниками сімейства СЕА. Ора-CEACAM5 взаємодіє з багат шаровим плоским епітелієм і підтримує тривалу колонізацію гонококами нижніх статевих шляхів, тоді як зв'язування білка Ора з CEACAM1 в епітелії матки підсилює гонококову асоціацію та проникнення в тканини. Хоча ці Ора-залежні взаємодії з CEACAM-позитивним епітелієм сприяють інфікуванню жіночих статевих органів, зв'язування Ора з нейтрофілами, які експресують різні CEACAM, урівноважує місцевий стан шляхом сприяння більш ефективному гонококовому кліренсу.

1.6.3 Яєчники

CEACAM1 не експресується в нормальних яєчниках [16]. Його експресія є негативною або слабкою (мембранною) в разі доброякісних епітеліальних

пухлин яєчників [120]. Злоякісні новоутворення характеризуються вираженою надекспресією CEACAM1 у тканині. Менш агресивні (low-grade) серозні аденокарциноми мають переважно мембранну (апикальну), тоді як більш агресивні (high-grade) пухлини – переважно цитоплазматичну експресію CEACAM1. Висловлюється припущення, що мембранна експресія є індикатором підтримання адгезивних властивостей клітин (проти дія метастазування), тоді як цитоплазматична експресія CEACAM1 супроводжується втратою цих властивостей із набуттям клітинами метастатичних властивостей [120]. Муцинозні карциноми яєчників продукують ці білки переважно в цитоплазмі, ендометріюїдні – на мембрані (апикально) та у цитоплазмі, інші епітеліальні злоякісні пухлини яєчників (мезонефральна потокова карцинома, злоякісна пухлина Бреннера, перехідно-клітинна карцинома, світлоклітинна та недиференційована карциноми) мають мембраноцитоплазматичну експресію CEACAM1. Перехідноклітинна карцинома має найвищу експресію серед епітеліальних пухли [120].

Усі пухлини статевого тяжа яєчників та герміногенні пухлини (окрім злоякісної тератоми) мають цитоплазматичну експресію CEACAM1 у неопластичних клітинах. Вторинні (метастатичні) пухлини були також CEACAM1-позитивними, показуючи позитивний імуногістохімічний сигнал у цитоплазмі (метастази з шлунка та кишківника) та мембрані (метастази з кишківника) неопластичних клітин [120].

1.6.4 Яєчка

Імуноблот нормальної тканини яєчок та їх придатків, а також пухлин яєчок (семіноми та тератоми) дозволив виявити в них наявність CEACAM1. Їх кількість була статистично вищою в неопластичній тканині, порівняно з нормою. CEACAM1 були наявні також у спермі [139]. Під час ІГХ-дослідження виявлено їх експресію між клітинами Сертолї та у контактах

клітин Сертолі з герміногенними клітинами, які є SEACAM1-негативними, у каналцях яєчок, а також на апікальній поверхні епітеліальних клітин придатка яєчка. Клітини Лейдіга та стромальні судини не мали експресії SEACAM1 [139]. Звивисті каналці яєчок без герміногенних клітин (у яких були наявні лише клітини Сертолі) не мали цих білків на мембрані суспендоцитів. Ураховуючи вищезазначене, було зроблене припущення, що SEACAM1 у яєчках бере участь у поляризації, диференціюванні, дозріванні, утриманні (адгезії) та вивільненні сперматогенних клітин [139].

Натомість герміногенні cancer in situ ураження супроводжувалися поширенням експресії на всій поверхні клітин Сертолі (до базальної мембрани), хоча пухлинні клітини були негативними. До того ж спостерігалось виникнення SEACAM1-позитивних судин у солідних пухлинних вогнищах семіноми за умови їх відсутності в прилеглому інтерстиції. Необхідно зазначити, що подібна динаміка змін маніфестації білків у суспендоцитах виявлена в разі ураження сперматогенезу (гіпосперматогенних каналцях та експериментальному порушенні сперматогенезу) [139].

1.6.5 Передміхурова залоза

SEACAM1 бере участь у розвитку тканини передміхурової залози, формуванні ацинарно-залозистих структур, виникненні в них просвітів. У нормі SEACAM1 експресується люмінальною поверхнею секреторних клітин простатичних залоз та протоків за їх відсутності в прилеглих судинах [110]. Ця сама особливість маніфестації білків зберігається і в разі гіперплазії. У дослідженні, проведеному С. Busch та ін., виявлено слабку навіть цитоплазматичну експресію SEACAM1 у люмінальних клітинах та більш інтенсивну експресію в цитоплазмі базальних протоковоацинарних клітин.

Виникнення простатичної інтраепітеліальної неоплазії (prostate intraepithelial neoplasia – PIN) супроводжується зниженням інтенсивності

апикальної експресії CEACAM1 за low-grade PIN [110, 140] та їх зникненням із поверхні епітеліальних клітин за high-grade PIN. Одночасно з'являється експресія CEACAM1 у майже всіх прилеглих до інтраепітеліальних проліфератів кровоносних судинах. У разі аденокарцином передміхурової залози спостерігається виражена варіабельність експресії CEACAM1 у неопластичних клітинах та пухлинних судинах. Виявлено наявність цих білків на апикальній поверхні клітин пухлинних тубулозалолистих структур за ступенів Глісона 1–3 з одночасним зменшенням CEACAM1-позитивних судин (слабка реакція в поодиноких судинах); за ступеня Глісона 4 або 5 ці білки наявні у більшості кровоносних судин, хоча повністю відсутні у неопластичних клітинах. Відсутність експресії CEACAM1 спостерігається і в метастазах раку передміхурової залози (РПЗ) у лімфатичні вузли [140]. Дерегуляція CEACAM1 у разі прогресування РПЗ супроводжується зниженням експресії E-кадгерину та оклюдину, а також зростанням проліферативної активності пухлинних простатоцитів за відсутності впливу на їх апоптоз (експресія TUNEL) [110].

Дослідження, проведені S. Ergun та ін., свідчать про участь CEACAM1 в ангиогенезі передміхурової залози при неопластичній трансформації [141], який може бути опосередкований VEGF. Надекспресія CEACAM1 у клітинах РПЗ Du-145 інгібує експресію VEGF-A, -C, -D, колагену 18 та ангиопоетину 2 (ангіогенно-супресивний ефект CEACAM1), водночас індукує експресію ангиопоетину 1. Взаємозв'язок CEACAM1 з VEGF-C та D свідчать про участь цих білків не лише в ангиогенезі кровоносних судин, а й лімфатичних. Установлена участь CEACAM1 у VEGF-опосередкованій міграції ендотеліоцитів та формуванні судиноподібних тубулярних структур. Протилежно спрямована динаміка експресії CEACAM1 та VEGF-A була підтверджена в нормальній та неопластичній тканині передміхурової залози при ІГХ-дослідженні. CEACAM1-позитивні судини при high-grade PIN мають підвищену ендотеліальну фенестрацію, порушення міжендотеліальних контактів та деградацію базальної мембрани.

На противагу вищезазначеному під час вивчення впливу CEACAM1 на біологічну поведінку клітин РПЗ DU-145 встановлено, що ці білки не змінюють їх проліферативної активності та здатності до апоптозу (оцінювалась експресія білків bcl-2 та bax), а також секрецію ними VEGF. Водночас вони пригнічують неоваскуляризацію тканин, блокують міграцію та проліферацію ендотеліоцитів (HRAEC та HUVEC), стимулюють їх апоптоз, що може бути розцінено як пухлино-супресивні ефекти CEACAM1 [142]. Під час дослідження непухлинних клітин РПЗ (NbE) встановлено, що пригнічення експресії в них C-CAM1 призводить до пухлинної трансформації. Це ж підтверджено й у культурі неопластичних клітин передміхурової залози (PC-3) – експресія C-CAM1 пригнічує їх агресивність.

Крім того, експресія комбінації генів Ceacam1/BRCA1 (топ-пара генів) є визнаним індикатором відбору пацієнтів із прогресуванням РПЗ після радикальної простатектомії та здатності цих пухлин до метастатичного поширення [328]. Ген Ceacam1 є андроген-залежним геном – андрогени індукують його експресію ліганд-опосередкованим шляхом. Андроген-незалежний рак передміхурової залози та її метастази в кастрованих мишей TRAMP є CEACAM1-негативними, хоча втрата експресії CEACAM1 виникає до того, як клітини стають невідповідними андрогенним стимулам. Усупереч цьому в Hsieh J. дослідженні та ін. у кастрованих щурів виявлено підвищену експресію C-CAM (аналог CEACAM1 людини) [143]. Експресія генів CEACAM5 зростає за неопластичної трансформації у передміхуровій залозі.

Слід зазначити, що дані, висвітлені у розділі «Вступ», є частиною монографії «Молекули клітинної адгезії раково-ембріонального антигену (CEACAMs)» [144], яка написана та опублікована у рамках виконання науково-дослідної роботи «Розробка методу діагностики пухлин органів репродуктивної системи з використанням молекул клітинної адгезії раково-ембріонального антигену».

2 ЕПІДЕМІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПУХЛИН РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ

2.1 Епідеміологічні особливості раку молочної залози

Захворюваність на злоякісні пухлини в Україні знаходиться на високому рівні (рис. 2.1), у середньому складаючи $332,52 \pm 19,46$ на 100 тис. населення. Серед них 71,5% припадає на міське населення, 28,5% випадків виявлено у жителів сільської місцевості. РМЗ займає одну з лідируючих позицій у структурі онкологічної патології – за останні 10 років цей показник у середньому дорівнює $64,51 \pm 2,85$ на 100 тис. населення. Більшість випадків (99,2%) виявлено у пацієнтів жіночої статі, і лише 0,8% випадків спостерігалось у чоловіків.

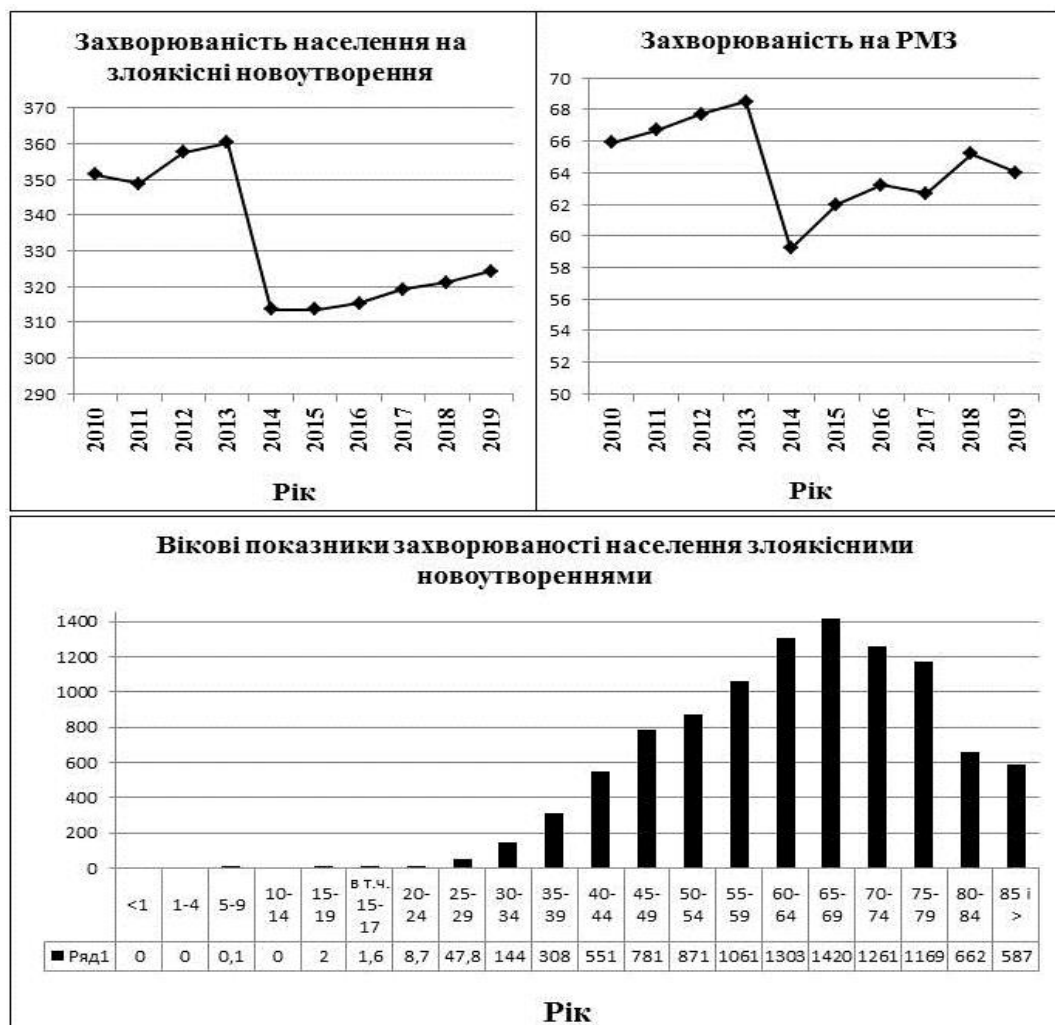


Рисунок 2.1 – Показники захворюваності на злоякісні пухлини (в тому числі РМЗ) в Україні у період з 2010 по 2019 рр на 100 тис. населення

Незважаючи на незначне покращення показників, починаючи з 2014 року, останнім часом спостерігається тенденція до наближення показників захворюваності на злоякісні пухлини, у тому числі і РМЗ, до рівня попередніх років. Основний пік ураження молочних залоз злоякісними пухлинами виявлено у жінок у постменопаузному періоді з поступовим зниженням цього показника у людей літнього віку (рис. 2.1). З одного боку, це пов'язано з віковою та дисгормональною залежністю розвитку РМЗ. З іншого боку, регрес у захворюваності після 70 років є прямо пропорційним відображенням загальної виживаності людей у цьому віці. Серед усіх морфологічних форм РМЗ більша половина випадків має гістологічний діагноз «Інвазивний рак неспецифічного типу» різного ступеню диференціювання з та без метастатичного ураження лімфатичних вузлів та інших органів.

2.2 Епідеміологічна характеристика первинного раку маткових труб

При вивченні епідеміологічних даних захворюваності на ПРМТ у Сумській області за даними канцер-реєстру СОКОД упродовж періоду 2011-2015 років було виявлено, що в 2011 році спостерігаються підвищення захворюваності в 2,5 рази в порівнянні з загальноукраїнськими показниками. У період 2012-2013 роки та в 2015 році показники захворюваності в Сумській області в 2 рази нижчі за загальнодержавні. У 2014 році відповідний показник захворюваності співпадає із загальноукраїнським (рис. 2.2).

За даними Національного канцер-реєстру, у період 2005-2015 років у Сумській області було зареєстровано 32 випадки ПРМТ (у середньому в рік – 2,9 випадків), що склало 1,13% серед усіх раків жіночих статевих органів і 4,36% – серед злоякісних пухлин додатків матки.

Щодо розподілу по районах, то згідно даних відділу статистики при Сумському обласному клінічному онкологічному диспансері відносно високі

показники захворюваності на ПРМТ спостерігаються в Конотопському, Липоводолинському, Охтирському та Роменському районах при значно нижчих показниках у Білопільському, Шосткинському, Глухівському, Путивльському, Краснопільському районах та м. Суми (рис. 2.3). Крім того, у Ямпільському, С-Будському, В-Писарівському, Тростянецькому, Буринському, Лебединському та Недригайлівському районах за даний період не зареєстровано ні одного випадку ПРМТ.

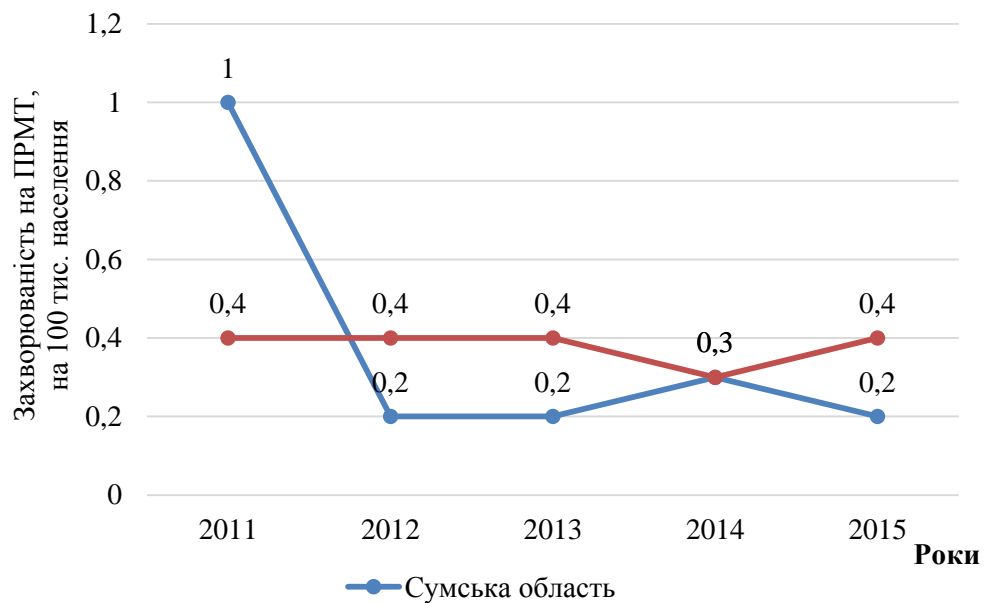


Рисунок 2.2 – Показники захворюваності на ПРМТ у Сумській області та Україні упродовж 2011-2015 років

Вік хворих з ПРМТ у досліджуваній групі (71 випадок) коливався в межах від 35 до 89 років, в середньому складаючи $61,1 \pm 7,8$ років. Найбільш часто ПРМТ спостерігався у віковій групі 50-69 років (51 випадок, або 71,8%).

49 жінок (69,0%) з ПРМТ були в постменопаузі, з середнім періодом після менопаузи 6,3 років (діапазон: від 1 до 32 років) (рис. 2.4).

При аналізі характеру пухлинного росту ПРМТ були виділені такі особливості: у 83,1% випадків відмічено одностороннє ураження, причому ліва МТ вражалась пухлиною дещо частіше (31 випадок, 43,7%), ніж права

(28 випадків, 39,4%), але ця різниця не була статистично достовірною ($p > 0,05$). Двобічне ураження спостерігалось в 12 випадках (16,9%).

Достовірно частіше злоякісна пухлина розташовувалася в ампулярному відділі МТ.

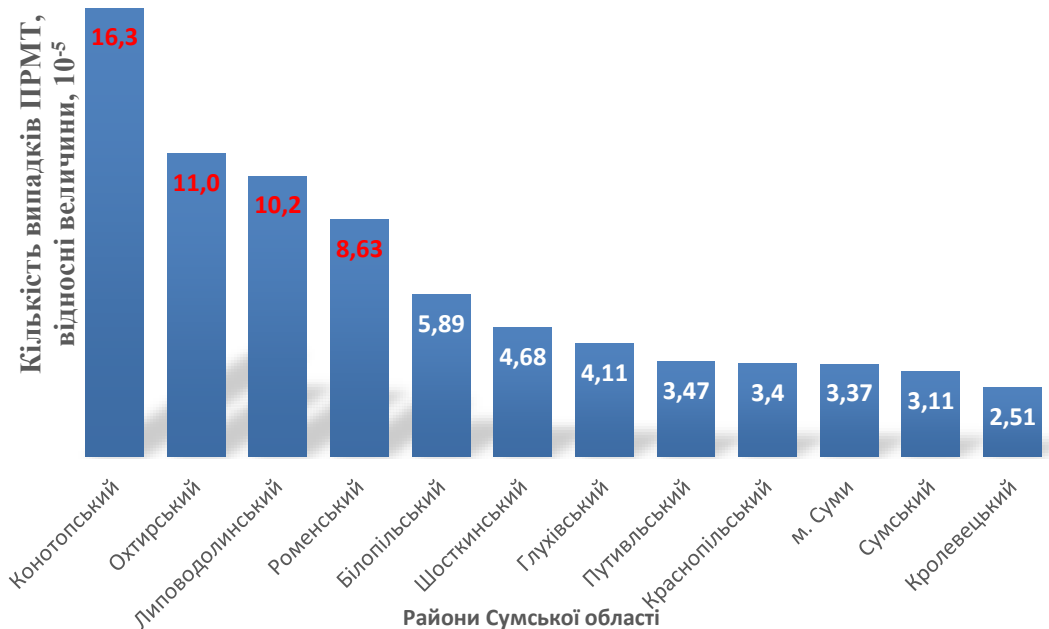


Рисунок 2.3 – Захворюваність ПРМТ у Сумській області за 2005-2015 роки (відносні величини, 10⁻⁵)



Рисунок 2.4 – Розповсюдженість ПРМТ у залежності від вікового періоду життя жінки

2.3 Епідеміологічна характеристика раку передміхурової залози

Для епідеміологічної оцінки РПЗ були проаналізовані показники Національного канцер-реєстру, Сумського обласного канцер-реєстру та відділу статистики Сумського обласного клінічного онкологічного диспансеру за період з 2010 по 2017 роки. Аналіз даних вказує на те, що первинна захворюваність на РПЗ в Україні знаходиться стабільно на високому рівні з тенденцією до зростання (рис. 2.5).

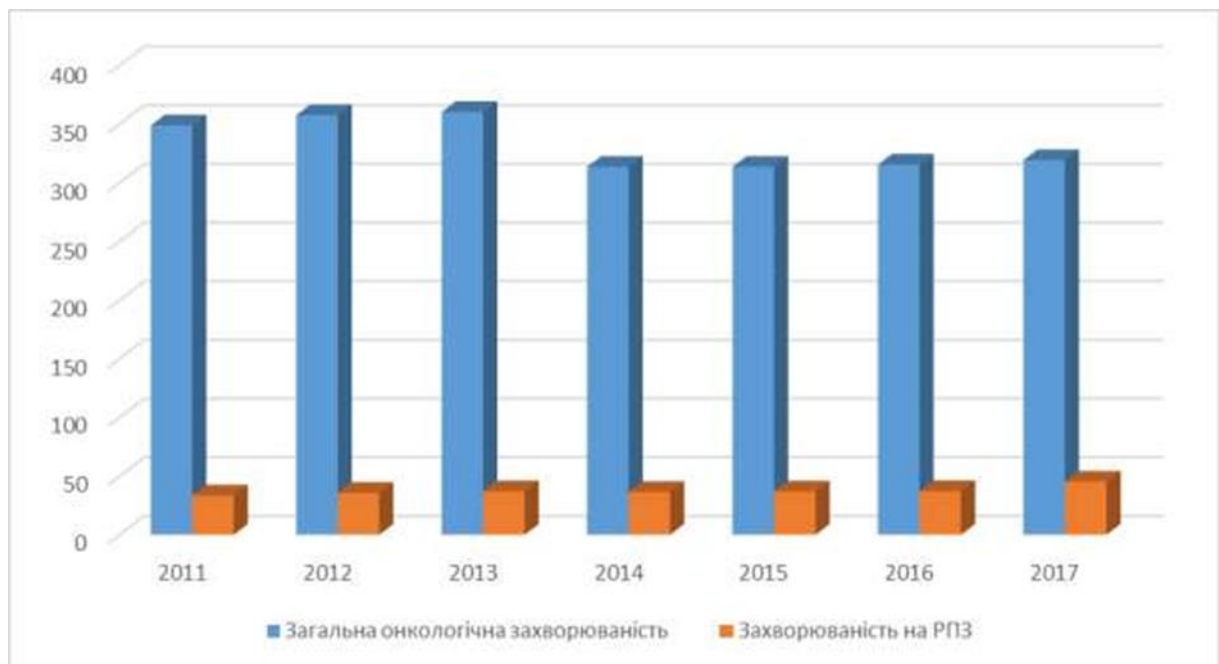


Рисунок 2.5 – Захворюваність на РПЗ та загальна онкологічна захворюваність населення України у 2011-2017 роках (на 100 тис. населення)

Основними причинами зростання захворюваності є підвищення якості надання медичних послуг, впровадження скринінгових програм щодо виявлення РПЗ, широке використання малоінвазивних методів діагностики (серологічне визначення рівня ПСА, УЗД). До факторів, які зумовлюють зростання показників захворюваності також слід віднести погіршення

Впродовж 2010-2017 років в Сумській області спостерігався стабільно високий рівень захворюваності на РПЗ, який складав в середньому $34,48 \pm 3,48$ на 100 тис. на селення. У порівнянні із загальнодержавним показником

($36,79 \pm 1,39$ випадків на 100 тис. населення) достовірної різниці виявлено не було ($p > 0,05$). Тобто, показник захворюваності на РПЗ серед жителів Сумської області відповідає загальнодержавним показникам, однак також має тенденцію до зростання (рис. 2.6).

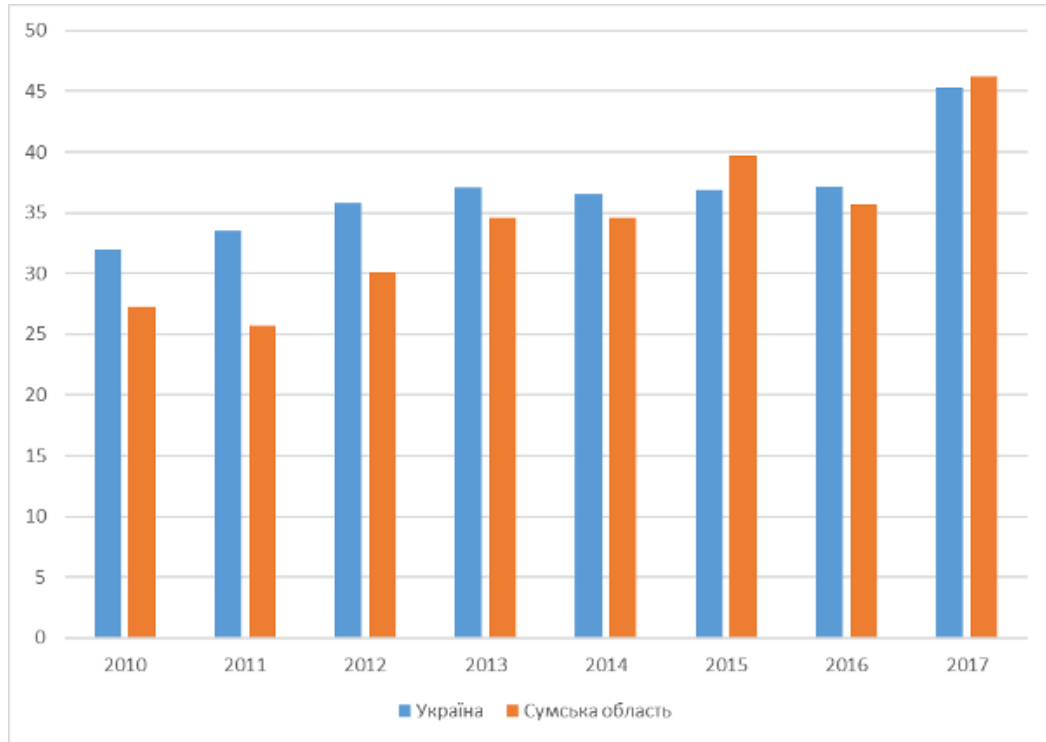


Рисунок 2.6 – Порівняння захворюваності на РПЗ в Україні та Сумській області впродовж 2010-2017 років (на 100 тис. населення), середні показники

До регіонів Сумської області з найвищою захворюваністю на РПЗ належать Великописарівський ($46,14 \pm 5,02$), Буринський ($42,54 \pm 6,37$),

Недригайлівський ($41,08 \pm 5,61$), Лебединський ($38,33 \pm 5,84$) райони та м. Суми ($45,00 \pm 4,55$). Середні показники захворюваності на РПЗ у цих районах були вищими за загальнодержавні та поступово зростали впродовж періоду спостереження (2010-2017 рр.). Найнижчим рівнем захворюваності на РПЗ характеризувалися Конотопський ($24,86 \pm 3,55$), Роменський ($26,0 \pm 2,94$),

Ямпільський ($28,2 \pm 4,86$), Путивльський ($29,02 \pm 1,48$) та Липоводолинський ($29,15 \pm 6,69$) райони Сумської області (рис. 2.7). Ці

регіони також характеризувалися відсутністю значного коливання показників, хоча мали тенденцію до зростання.

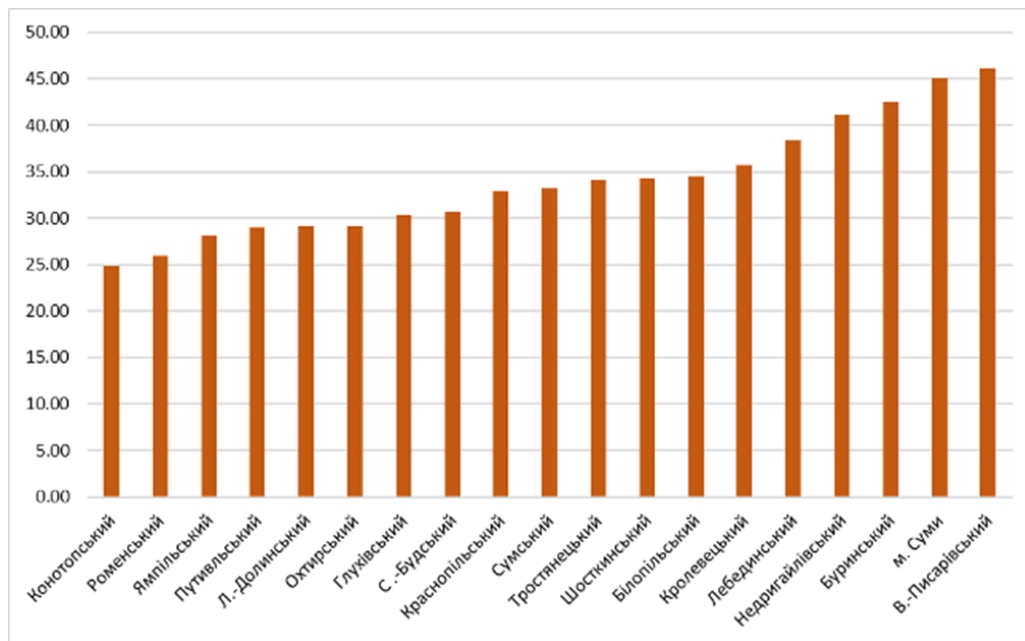


Рисунок 2.7 – Середні показники захворюваності на РПЗ в Сумській області у 2010-2017 рр. (на 100 тис.населення). Дані представлені за зростанням

За даними Національного канцер-реєстру України, за період з 2010 по 2017 роки в Сумській області було зареєстровано 1418 нових випадків РПЗ (в середньому $177,25 \pm 12,55$ випадків на 100 тис. населення у рік).

Аналіз кількісних показників захворюваності на РПЗ серед районів Сумської області вказує на значну неоднорідність та варіабельність цих величин. Хоча Сумська область характеризується нижчим середнім рівнем захворюваності на РПЗ у порівнянні із загальнодержавними показниками, однак впродовж періоду спостереження дана різниця скорочується і у 2017 році цей показник був вищим за національний. Географічні відмінності між регіонами, концентрація хімічної та машинобудівної промисловості у південній частині Сумщини, а також відмінності у соціально-демографічному супроводі населення та їх комбінація можуть обумовити різницю рівнів захворюваності на РПЗ між районами Сумської області.

Таким чином, нами був проаналізований епідеміологічний статус РПЗ серед регіонів України та Сумської області. Були виявлені тренди у динаміці захворюваності на РПЗ, а також їхня територіальна залежність. Порівняння даного показника в Сумській області показало його відповідність до загальнодержавних значень. Також простежується динаміка до поступового зростання захворюваності на РПЗ як серед усіх регіонів Сумської області, так і України.

2.4 Епідеміологічна особливості ендометріальних карцином

Аналізуючи статистичні дані канцерреєстру у період з 2011 по 2017 роки (рис. 2.8) встановлено, що захворюваність на злоякісні пухлини, як в Україні, так і у Сумській області знаходиться на стабільно високому рівні ($332,6 \pm 21,8$ та $415 \pm 9,6$ випадків на 100 тис. населення (в.н.100т.н.) відповідно). Контингент же хворих за звітний період становить $2302,1 \pm 72,5$ по Україні та $2771,3 \pm 205,9$ в.н.100т.н. по Сумській області.

Серед них неоплазії тіла матки посідають 3 місце (після злоякісних пухлин молочної залози та шкіри), складаючи $29,4 \pm 1,5$ та $35,9 \pm 4,3$ в.н.100т.н. відповідно. У віковому аспекті виявлено, що пік захворюваності припадає на 55-69 (59%) років та має загальну тенденцію на всій території держави. Дорічна летальність у жінок в Україні та Сумській області, яким встановлено діагноз злоякісна пухлина тіла матки, становить $9,2 \pm 1,9\%$ та $8,9 \pm 1,1\%$. Питома вага онкохворих, які прожили 5 та більше років після встановлення діагнозу становить $67,1 \pm 0,7\%$ та $65,3 \pm 1,4\%$ відповідно. Виявлено, що смертність від карцином тіла матки за звітний період у середньому по Україні становить $7,7 \pm 0,59$ в.н.100т.н., у Сумській області цей показник складає $9,51 \pm 1,57$.

Аналізуючи дані гістологічного дослідження при СОКОД, виявлено, що найбільш поширеним гістологічним варіантом злоякісних неоплазій у Сумській області є ЕА різного ступеня злоякісності (81,5%). Серед них

високодиференційовані неоплазії виявлено у 20%, помірнодиференційовані – у 72% та низькодиференційовані – у 8%.

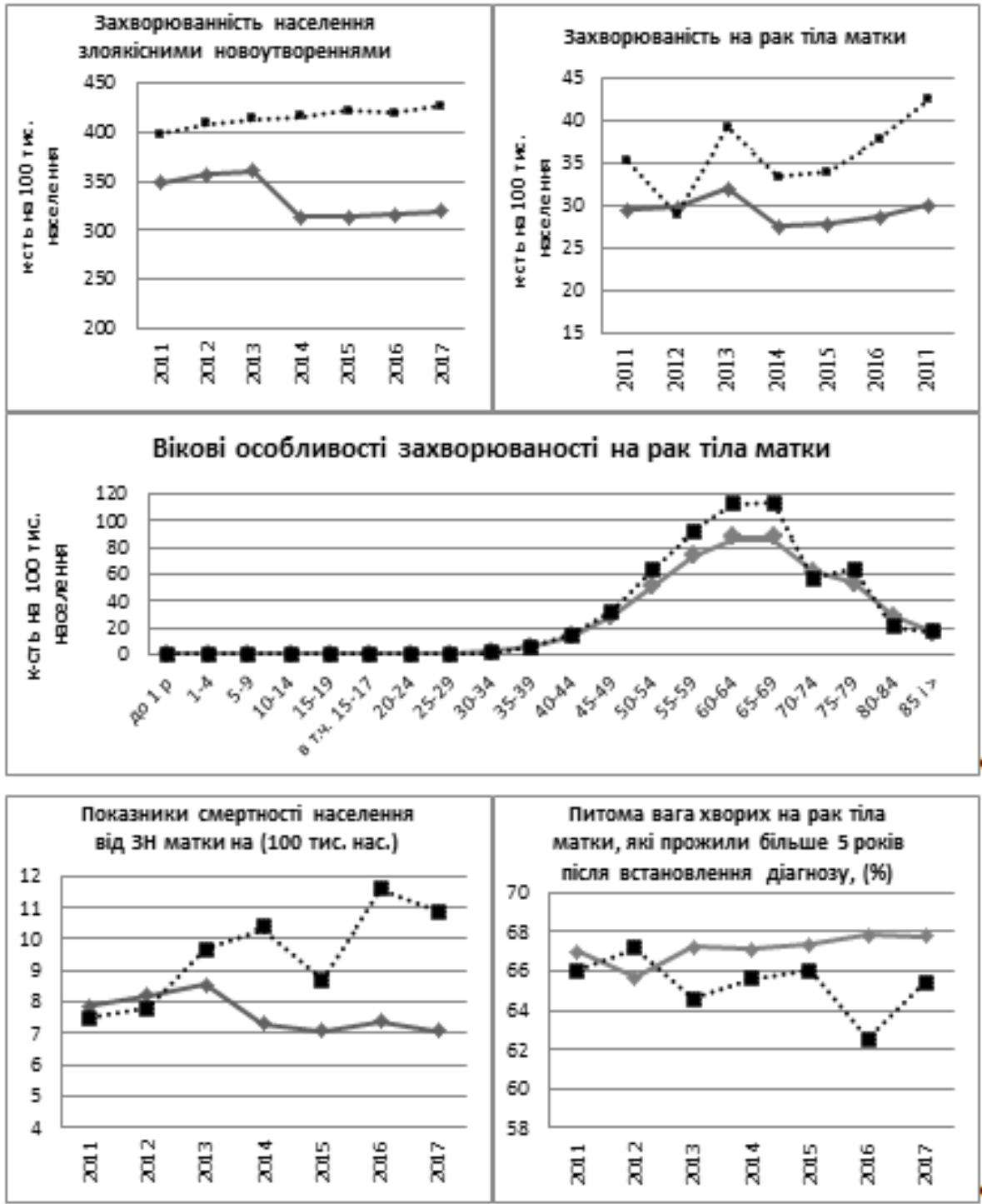


Рисунок 2.8 – Захворюваність населення України (—◆—) та Сумської області (...■...) на злоякісні пухлини

Серед інших варіантів пухлин у 2,5% спостерігаються світлоклітинна і серозна та у 5% муциозна аденокарциноми. У 6,4% діагностовано змішану

злоякісну пухлину мезенхімально-епітеліального походження (гомологічну карциносаркому). Плоскоклітинний рак, ендометріальну саркому та лейоміосаркому виявлено у поодиноких випадках.

2.5 Захворюваність на злоякісні пухлини яєчка

Згідно результатів проведеного аналізу виявлено, що найбільша захворюваність на рак яєчка в Україні серед дорослого населення була в 2013 році (3,11 на 100 тис. населення), найнижча – в 2017 році (2,4 на 100 тис. населення). У той же час, частота розповсюдженості даної патології в Сумській області відрізнялась від загальноукраїнських показників: найвищий рівень у 2017 році (4,33 на 100 тис. населення), а найнижчий – у 2019 році (1,96 на 100 тис. населення). Виходячи з цього, на противагу тенденції до зниження показників захворюваності на рак яєчка в Україні, відмічається поступове збільшення захворюваності в Сумській області з перехрестом (зростання та зниження захворюваності) у 2013-2014 роках (рис. 2.9).



Рисунок 2.9 – Показники захворюваності на рак яєчка в Україні та Сумській області серед дорослого населення в період 2011-2019 років. (на 100 тис. населення)

Аналіз вперше виявлених захворювань на дану патологію серед дорослого населення показав, що: максимальна кількість випадків раку яєчка в Україні склала – 525 у 2013 році, а мінімальна – у 2017 році (377 випадки). На противагу цьому, у Сумській області найбільше число хворих на рак яєчка виявлено в 2017 році – 18 випадків, а найменше – 2019 році (8 чоловіків) (рис. 2.10).

ЧИСЛО ВПЕРШЕ ВІЯВЛЕНОГО РАКУ ЯЄЧКА СЕРЕД ДОРΟΣЛОГО НАСЕЛЕННЯ

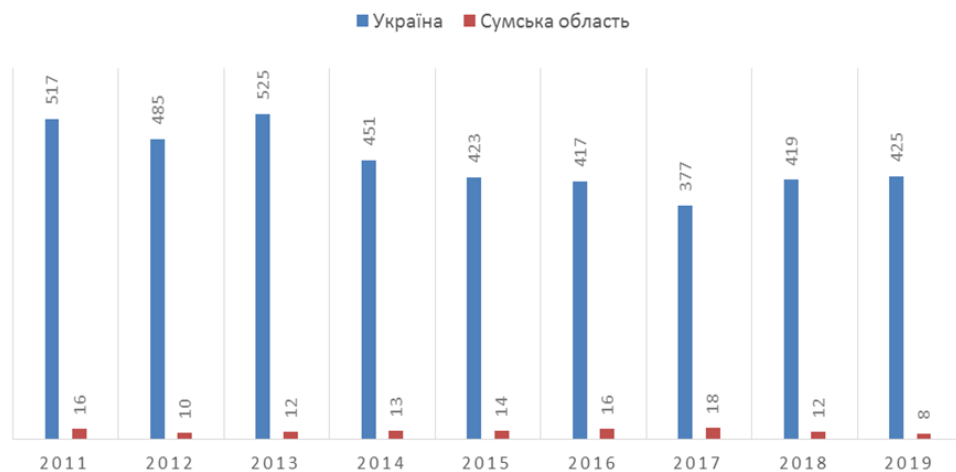


Рисунок 2.10 – Показники абсолютних чисел пацієнтів вперше виявленого раку яєчка в Україні та Сумській області серед дорослого населення в період 2011-2019 років

За результатами дослідження захворюваності населення на рак яєчок спостерігається певний зв'язок з віком. Установлено, що в цілому по Україні на дану патологію хворіли чоловіки переважно у віці 35-39 років (4,7 на 100 тис. населення), що співпадало з показниками у Сумській області (7,9 на 100 тис. населення). Проте, варто відмітити, що віковий діапазон захворюваності в обраній області був дещо ширшим та переважно вражав населення віком 30-39 років. Однак, як виняток, у 2017 році працездатне населення Сумської області найбільше хворіло на рак яєчка в 20-24 роки (9,9 на 100 тис. населення). У 2013 році показники захворюваності сягнули свого піку (8,3 на 100 тис. населення) у пацієнтів у віці 25-29 роки.

Важливо відмітити, що захворюваність на рак яєчка серед дитячого (0-18 років) населення по всій країні досить низька. Найвищий показник захворюваності на рак яєчок був зафіксований у 2012 та 2014 роках – 18 і 19 випадків (0,4-0,49 на 100 тис. населення) відповідно, а найнижчий – у 2011 році 4 випадки – (0,1 на 100 тис. населення). Такі показники можуть свідчити про зростання кількості нових хворих дитячого віку за останні роки та тенденцію до «омолодження» даної онкологічної патології. При цьому, в Сумській області, був зареєстрований лише один випадок онкопатології у дитини в 2012 році (1,08 на 100 тис. населення) та два випадки в 2019 році (2,3 на 100 тис. населення) (рис. 2.11).

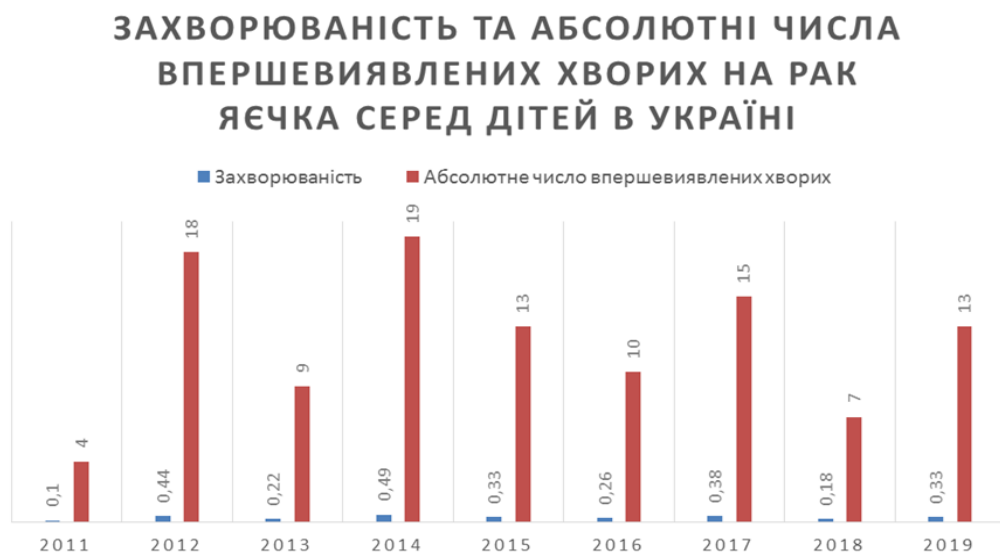


Рисунок 2.11 – Кількість випадків та частота захворюваності на рак яєчка в Україні серед дитячого населення в період 2011-2019 років

Таким чином, аналіз захворюваності на рак яєчка в Україні та Сумській області показав деякі відмінності у тенденціях до зростання цього показника на Сумщині. На нашу думку, така ситуація може пояснюватися погіршенням екологічної ситуації (забруднення довкілля солями важких металів), та особливостями діагностики у різні часи в Сумській області. Активізацію пухлинного росту і механізм канцерогенезу у інших органах репродуктивної системи в умовах забрудненого довкілля висвітлено у попередніх наших роботах. Подібний механізм може мати місце у чоловіків при раку яєчка.

3 УЧАСТЬ СЕАСАМ У ПРОГРЕСУВАННІ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Гістологічне дослідження нормальних тканин молочної залози, забарвлених гематоксиліном-еозином, дозволило виявити їх типову залозисто-протокову структуру. Епітеліальний компонент представлений внутрішнім люмінальним епітелієм, оточеним шаром базальних клітин. Стромальна частина молочної залози складається з волокнисто-жирової тканини з одиничними лейкоцитами та змінною васкуляризацією. У пухлинних тканинах були виявлені ділянки з різним ступенем їх злоякісності, а також нормальні вогнища молочної залози. Необхідно згадати, що тканини з лише одним морфологічним типом злоякісності були дуже рідкісними.

Імуногістохімічно було встановлено, що всі випадки та частини тканини РМЗ були позитивними до 6G5j. Отже, вони були використані для дослідження експресії СЕАСАМ1. Молочна залоза характеризувалася наявністю рецептор-позитивних клітин у всіх частинах її залозисто-протокової структури. Вони розташовуються на апікальній поверхні люмінальних клітин (рис. 3.1). Слід зазначити, що інтенсивність фарбування була різноманітною, хоча вона мала безперебійний характер розподілу. Крім епітелію, деякі внутрішньо- та позасудинні лейкоцити, міоепітеліоцити та поодинокі судини були також позитивними до СЕАСАМ1 (позитивний внутрішній контроль). Апокринний епітелій не мав жодної клітини з СЕАСАМ1.

Пухлинна тканина характеризувалася різними закономірностями експресії СЕАСАМ1 (рис. 3.2). У добре диференційованих пухлинах (областях) вони були виявлені на апікальній поверхні пухлинних клітин, які утворювали трубчасті структури. Після зникнення просвіту у трабекулярно-солідних утвореннях супроводжувалося їх зменшення та зникнення. З іншого боку, зростання клітинної атипії, що супроводжувало дедиференціацію пухлини, брало участь у дислокації СЕАСАМ1 від верхівкової поверхні клітин до всієї мембрани та їх цитоплазму. Пухлини зазвичай містили

ділянки з різними малюнками експресії SEACAM1 (як SEACAM1 позитивні, так і негативні, або з різними моделями експресії у позитивних випадках SEACAM1), що демонструють фенотипічну гетерогенність як у кожному окремому випадку, так і в кожній окремій області того ж випадку (рис. 3.3).

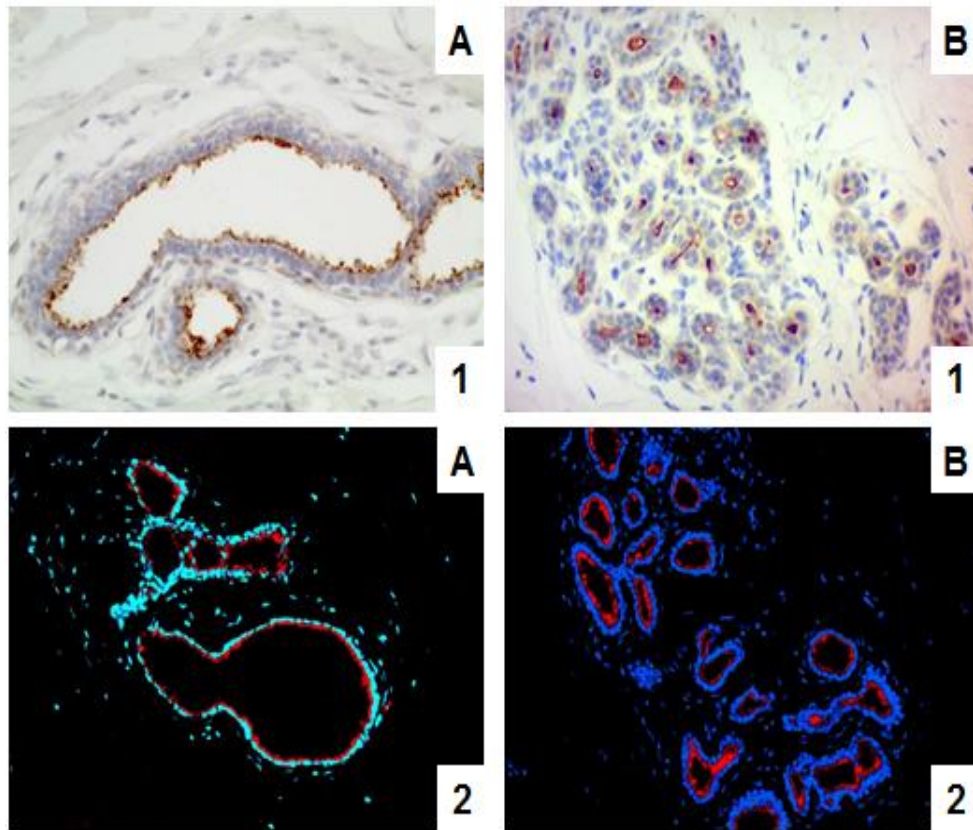


Рисунок 3.1 – Нормальна тканина молочної залози. А – протоки молочної залози, В – дольки молочної залози. Імуноферментне (1) та імунофлуоресцентне (2) дослідження SEACAM1 (SEACAM1 - червоний, DAPI - синій). Збільшення 1 - x400, 2 - x200

Це унеможливило прийняття рішення про SEACAM1-позитивний або SEACAM1-негативний статус пухлини. Крім цього, нормальна внутрішньо- та перитоморальна тканина молочної залози та інші види їх проліферативних порушень (включаючи осередки раку *in situ*) були присутніми між злоякісними тканинами. Інтраваскулярні та інтерстиціальні SEACAM1-позитивні лейкоцити з поодинокими судинами також були виявлені в пухлинних тканинах.

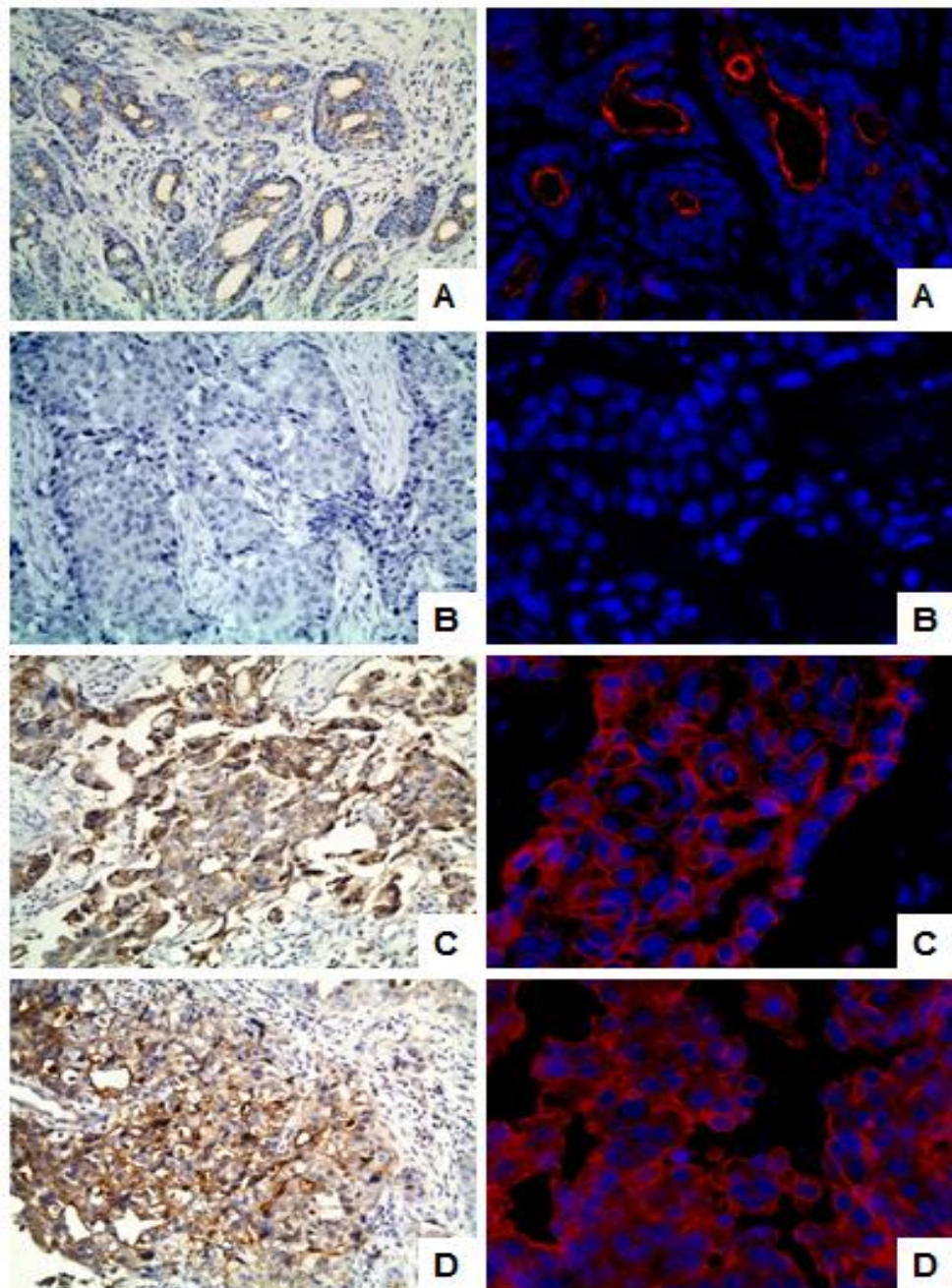


Рисунок 3.2 – Рак молочної залози. А - апікальна експресія CEACAM1, В – відсутність експресії CEACAM1, мембранна (С) та цитоплазматична (D) експресії CEACAM1. Імуноферментне (лівий стовпчик, x200) та імунофлуоресцентне (права колонка, x400) дослідження CEACAM1 (CEACAM1 - червоний, DAPI - синій)

Усі нормальні та злоякісні епітеліальні клітини експресують E-кадгеринові рецептори (рис. 3.4). Їх існування на поверхні пухлинних клітин довело дуктальне походження злоякісного процесу у карциномах високого

ступеня. Вони були присутні на базолатеральній поверхні між нормальними епітеліальними клітинами та у контактах клітин-ЕСМ.

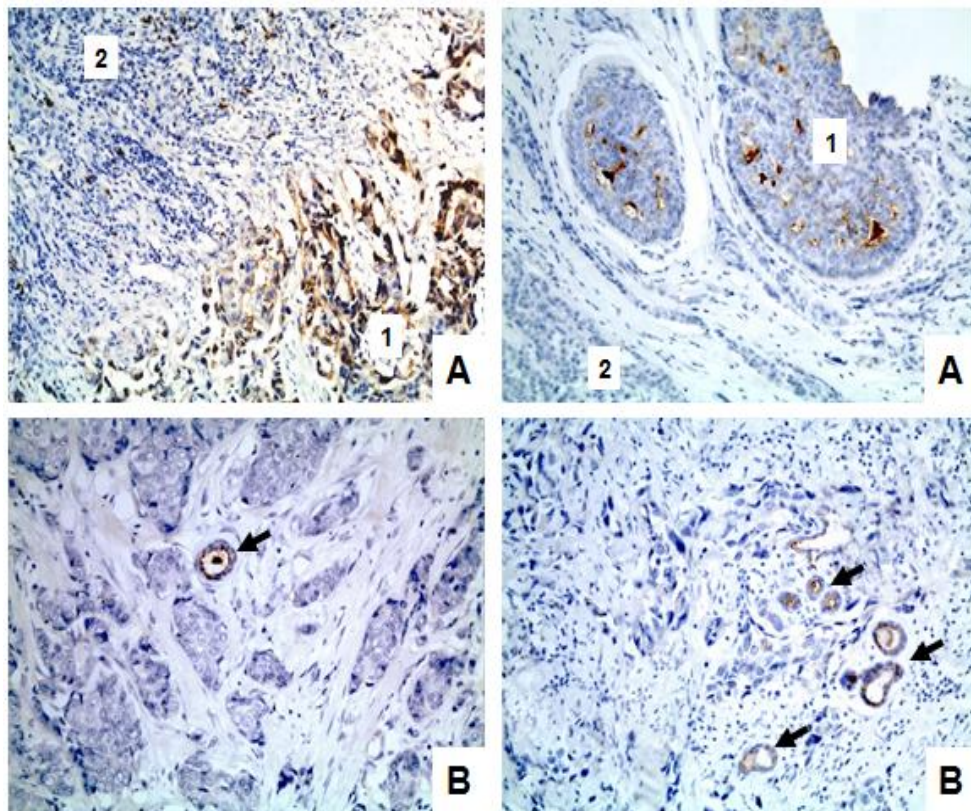


Рисунок 3.3 – Рак молочної залози. А - гетерогенні пухлині, які включають ділянки з позитивними пухлинами клітинами SEACAM1 (1) та негативними SEACAM1 (2), В - негативні пухлинні тканини SEACAM1 з ділянками нормальної тканини молочної залози (позначені стрілкою) з експресією SEACAM1 у клітинах просвіту. Імуногістохімічне дослідження SEACAM1.
Збільшення x200

Е-кадгеринові рецептори були виявлені між неопластичними клітинами та контактами клітин-ЕСМ, за винятком тих частин їх мембрани, які обмежували просвіти пухлинних структур. Інтенсивність експресії Е-кадгерину зменшувалася одночасно зі зростанням злоякісності пухлини. Подвійне імуофлюоресцентне забарвлення та імуногістохімічні дослідження серійних зрізів дозволили виявити зовсім різні експресовані схеми Е-кадгерину та SEACAM1 у нормальних та злоякісних клітинах.

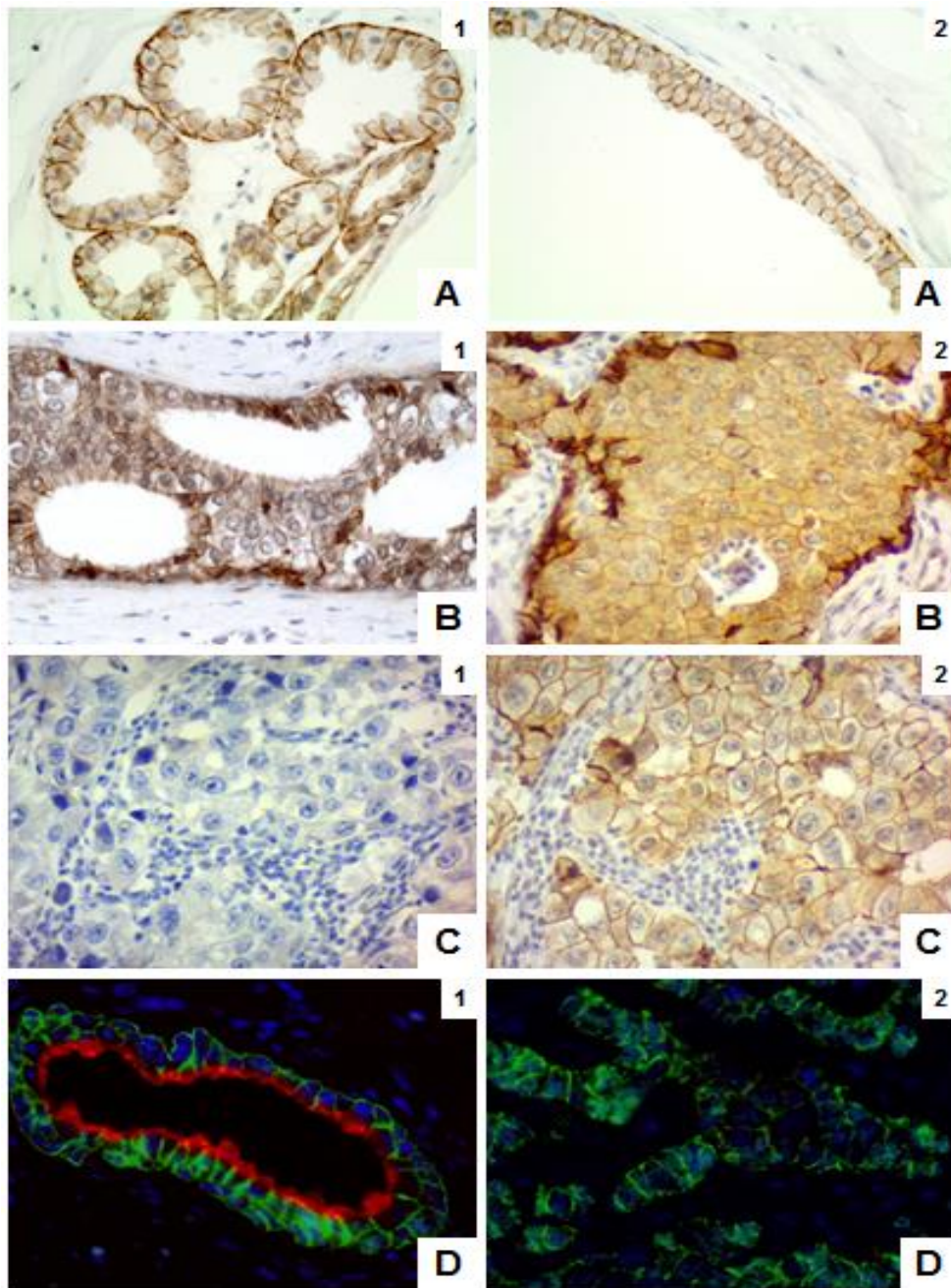


Рисунок 3.4 – Експресія Е-кадгерину в різних типах тканин молочної залози. А – базолатеральна експресія Е-кадгерину між нормальними епітеліальними клітинами в лобулярному (1) та протоковому (2) епітелії, В - експресія Е-кадгерину в тканині раку молочної залози. Відсутність цих білків у тих частинах мембрани (1), які обмежують просвіти пухлинних структур. С - серійні секції з дослідженням SEACAM1 (1) та Е-кадгерином (2). А, В, С - імуноферментне дослідження Е-кадгерину та SEACAM1 (С-1), х400. D - подвійне імунофлуоресцентне фарбування у нормальній (1) та раковій (2) тканині. х400

Вивчення експресії p53 в тканинах молочної залози виявило їх відсутність як в нормі, так і в частині злоякісних зразків (рис. 3.5).

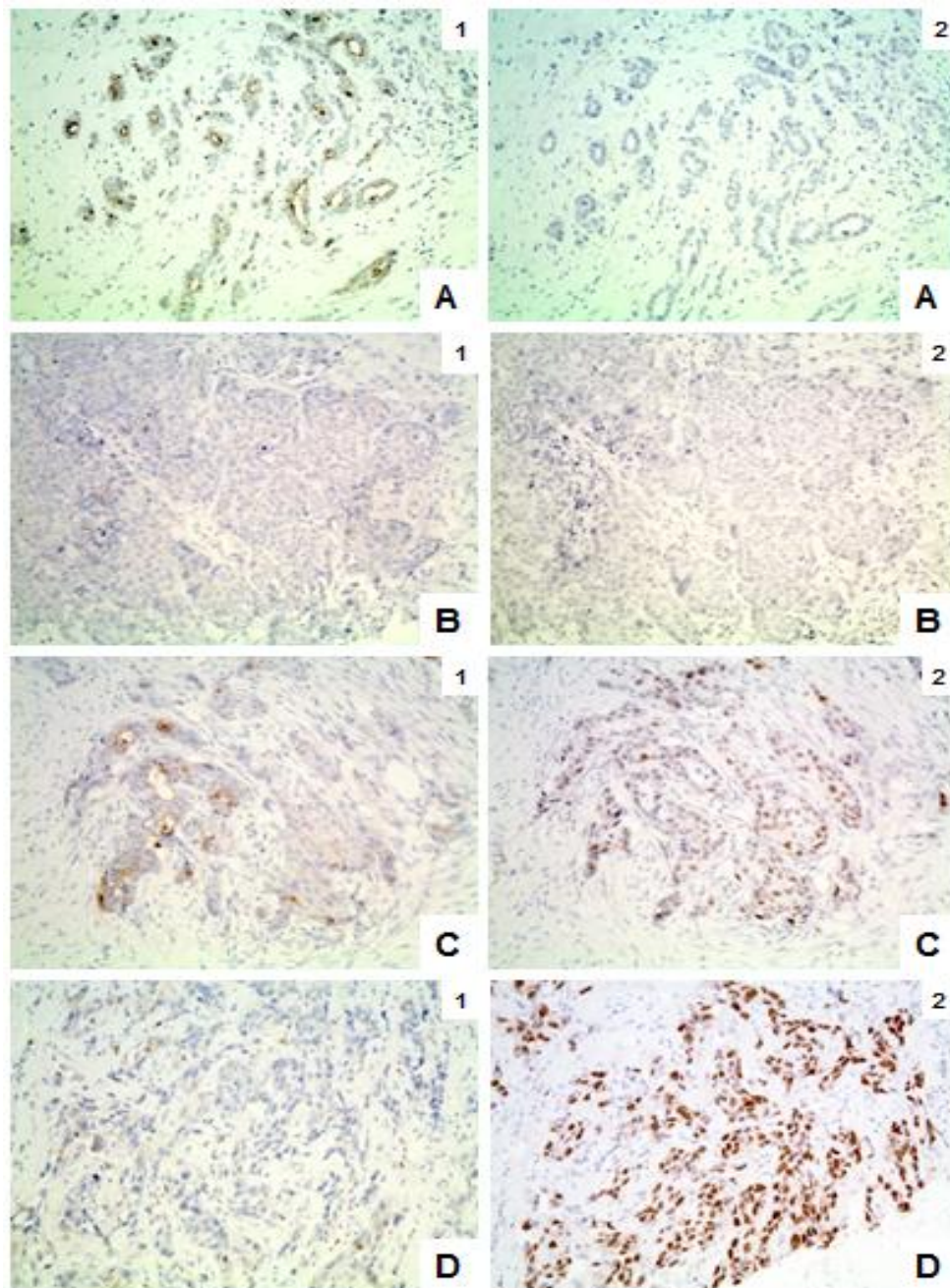


Рисунок 3.5 – Серійні відділи тканин раку молочної залози. Позитивна (А) і негативна (В) експресія SEACAM1 без експресії p53. Позитивна (С) та негативні (D) експресія SEACAM1з експресією p53. Імуногістохімічне дослідження рецепторів SEACAM1 (1) та p53 (2). Збільшення x200

Не було виявлено кореляції між наявністю SEACAM1 та p53 у різних типах тканин молочної залози. Важливо зазначити, що пухлинні тканини з

цитоплазматичними, мембранними та без CEACAM1 мали різні ядерні вираження p53. З одного боку, серійні розрізи дозволяють знайти їх як у позитивних, так і в негативних неопластичних зонах CEACAM1. З іншого боку, зміни прояву CEACAM1 не супроводжувалися подібними варіантами експресії p53. Нарешті, їх різнобічний вплив на прогресування пухлини було доведено у випадках з мономорфною експресією p53, коли всі ракові клітини були негативними або позитивними. Навіть у цих зразках були визначені ділянки з гетерогенною експресією CEACAM1.

Імуногістохімічно було зазначено, що як нормальні, так і злоякісні тканини молочної залози мали виражений VEGF. Вони були представлені позитивними гранулами DAB в цитоплазмі (рис. 3.6). Нормальна тканина мала переважно перинуклеарну локалізацію VEGF на апікальній стороні просвітницьких клітин. Неопластичні клітини втратили цю властивість, проявляючи дифузну локалізацію VEGF у своїй цитоплазмі. Більшість пухлин мали помірну та сильну кількість VEGF, хоча частина з них мала слабку експресію або навіть їх відсутність. Незважаючи на це, позитивні клітини VEGF були виявлені в різній пропорції серед запального інфільтрату та всередині судин, які були представлені різними типами лейкоцитів. Серійні зрізи дозволили виявити кореляцію між виразами CEACAM1 та VEGF. З одного боку, це було підтверджено наявністю VEGF у CEACAM1 позитивних та негативних випадках, з іншого боку частина позитивної тканини CEACAM1 була негативною на VEGF. Крім того, навіть гетерогенні новоутворення CEACAM1 часто мали схожу експресію VEGF.

На жаль, ми не знайшли прямих зв'язків між експресіями CEACAM1 та VEGF в ендотеліальних клітинах внутрішньопухлинних судин. Незважаючи на те, що переважна їх кількість була позитивно VEGF, лише деякі з них експресували рецептори CEACAM1.

Нормальна тканина молочної залози містила поодинокі позитивні клітини Ki-67. Деякі лімфоцити в навколишній стромі також експресують рецептори Ki-67.

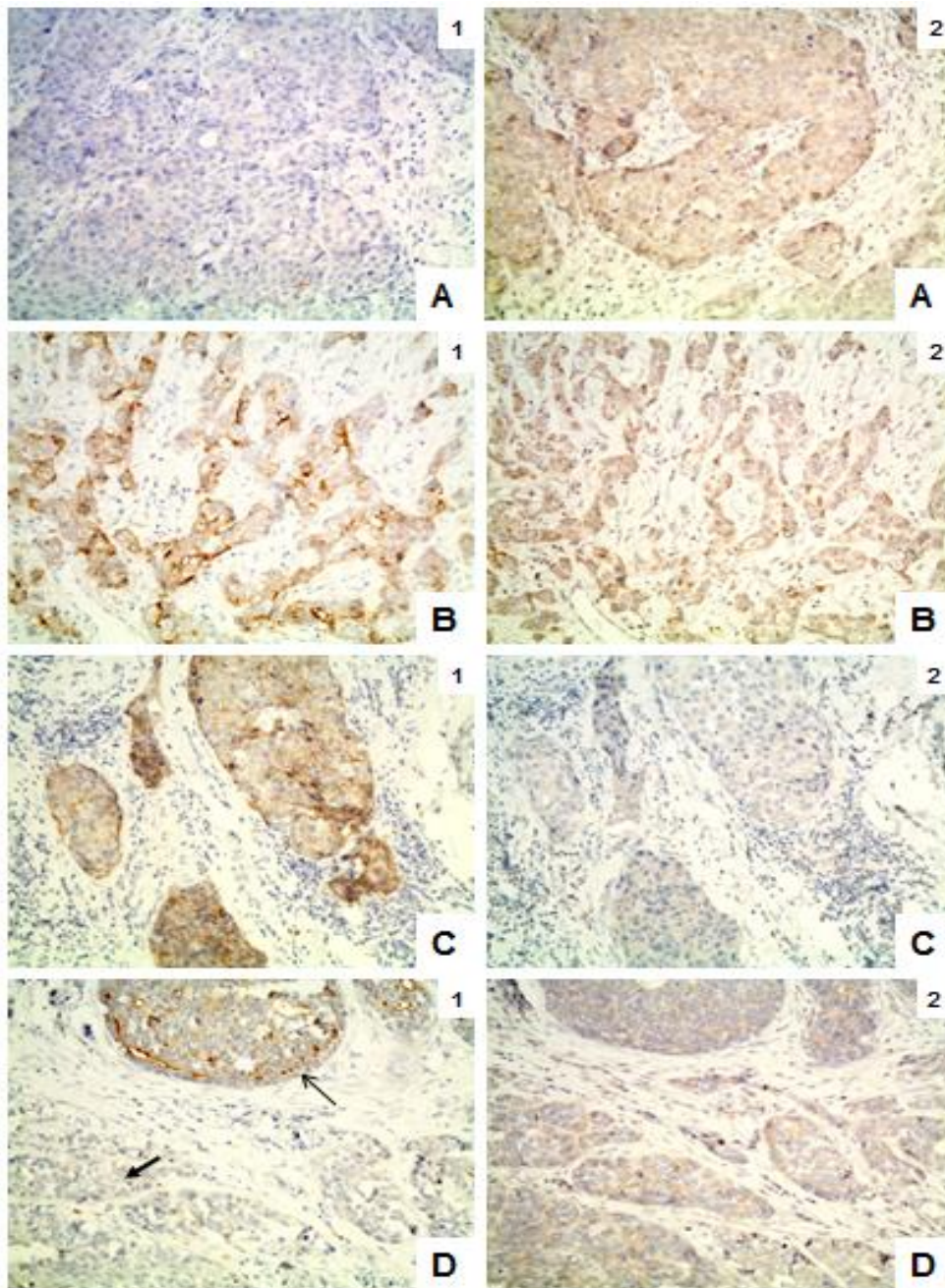


Рисунок 3.6 – Серійні зрізи тканин раку молочної залози. Пухлинна тканина SEACAM1 (A) негативна та SEACAM1 позитивна (B) з експресією VEGF. C - позитивна пухлинна тканина SEACAM1 без експресії VEGF. D - випадок раку молочної залози з гетерогенною експресією SEACAM1 та мономорфною експресією VEGF. Імуногістохімічне дослідження SEACAM1 (1) та VEGF (2). Збільшення x200

У тканинах пухлини ми виявили різні пропорції проліферативних клітин (рис. 3.7). Їх кількість коливалася від одиничних позитивних клітин до

майже всіх. Подібно до випадків непошкоджених молочних залоз, частина стромальних клітин також була позитивною для Кі-67.

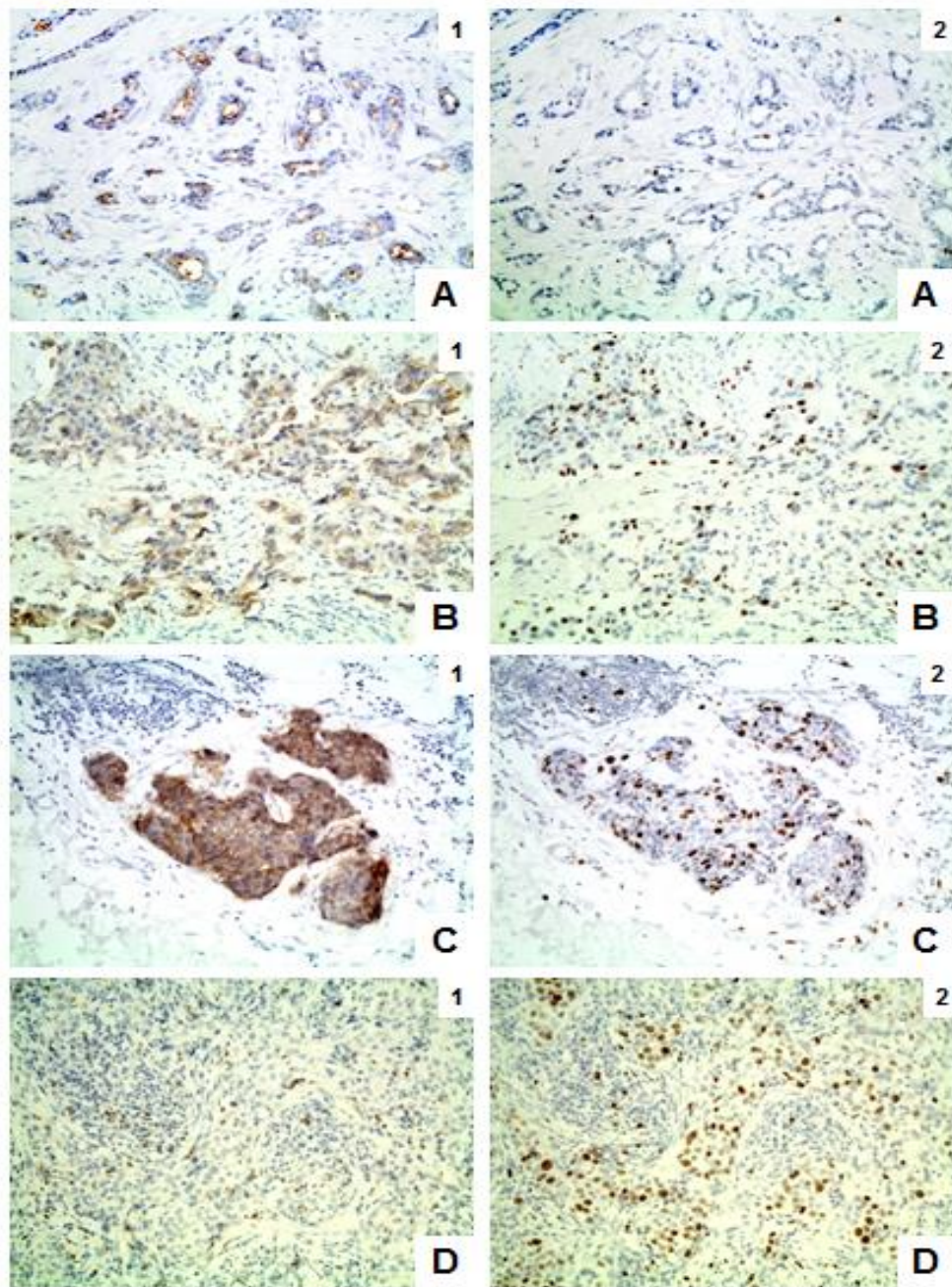


Рисунок 3.7 – Серійні відділи тканин раку молочної залози. Випадки пухлинної тканини мають апікальну мембрану (A), всю мембрану (B), переважно цитоплазматичну (C) та без (D) експресії SEASAM1. Імуногістохімічне дослідження SEASAM1 (1) та Кі-67 (2). Збільшення x200.

Глибокий аналіз серійних та подвійних забарвлених ділянок дозволив виявити сильний вплив існування SEASAM1 на проліферативну активність

неопластичних клітин. Тканина з апікальною локалізацією SEASAM1 (рис. 1.7) містила найменшу кількість позитивних клітин Ki-67, що наближалися до контрольних показників. Їх транслокація по всій поверхні клітини та в цитоплазму супроводжувалася посиленням проліферативної активності пухлини (рис. 3.8). Незважаючи на це, найбільша частка позитивних клітин Ki-67 виявлена в тканині негативної SEASAM1 пухлини.

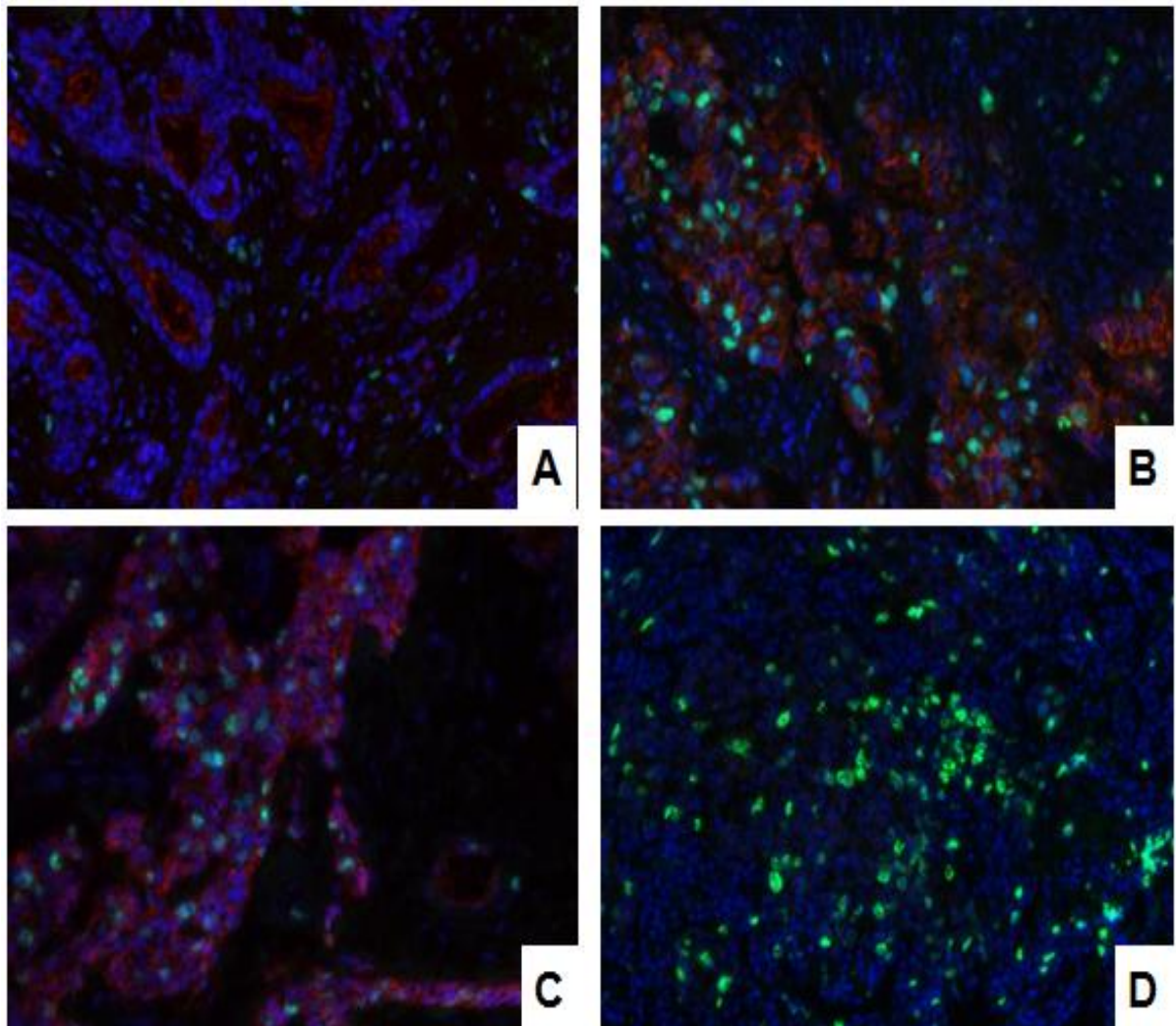


Рисунок 3.8 – Рак молочної залози. Випадки пухлинної тканини мають апікальну мембрану (A), всю мембрану (B), переважно цитоплазматичну (C) та без (D) експресії SEASAM1. Подвійне імунофлуоресцентне фарбування (SEASAM1 - червоний, Ki-67 - зелений, DAPI - синій). Збільшення x200

Незважаючи на статистичну перевірку зв'язків між виразами SEASAM1 та Ki-67, точні докази ми отримали лише у гетерогенних

пухлинах SEACAM1. З одного боку, неопластична тканина молочної залози без SEACAM1 мала значно більшу кількість рецепторів Ki-67 порівняно з позитивними фокусами SEACAM1. З іншого боку, навіть у SEACAM1 позитивної тканини області з більш сильним DAB-сигналом мали меншу кількість позитивних клітин Ki-67. Нарешті, варіації експресії SEACAM1 в одній структурі пухлини відбилися на проліферативній активності неопластичних клітин: збільшення проліферативних клітин при зменшенні існування SEACAM1.

4 ВСТАНОВЛЕННЯ ПРОГНОСТИЧНОГО ЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ СЕАСАМ1, СЕАСАМ5 ТА СЕАСАМ6 У ТКАНИНІ ЕНДОМЕТРІЮ

Експресію СЕАСАМ1 незалежно від фази менструального циклу було виявлено на апікальній поверхні люмінального та залозистого епітелію нормального ендометрію. Безперервне розташування СЕАСАМ1 на оберненій у просвіт порожнини матки та ендометріальних залоз поверхні клітин створювало враження бар'єру між зовнішнім середовищем та організмом жінок. Слід зазначити, що суцільне розташування СЕАСАМ1 виявлено також на поверхні секретованих ендометріальними клітинами везикулах (рис. 4.1). Крім того, значна кількість (але не всі) судин як ендометрію, так і міометрію були СЕАСАМ1 позитивними. Позитивним контролем взаємодії anti-СЕАСАМ1 мишачі mAb C5-1X/8 з рецепторами клітин ендометрію були внутрішньо-судинні та тканеві лейкоцити, частина з яких експресувала СЕАСАМ1.

Експресія СЕАСАМ5 рецепторів не була виявлена у тканині нормального ендометрію. Використання високочутливих anti-СЕАСАМ6 mouse mAb 1H7-4B дозволило встановити СЕАСАМ6 рецепторів на апікальній поверхні епітеліальних клітин окремих ендометріальних залоз. Позитивним внутрішнім контролем для anti-СЕАСАМ6 антитіл слугували також внутрішньо-судинні та тканеві лейкоцити.

Імуногістохімічне дослідження СЕАСАМ1 рецепторів у ендометріальних карциномах показало гетерогенне їх розташування у пухлинній тканині. Для ендометріюїдних аденокарцином була притаманна апікальна їх локалізація на внутрішній поверхні епітеліальних клітин при формуванні ними залозистих структур (low-grade tumors).

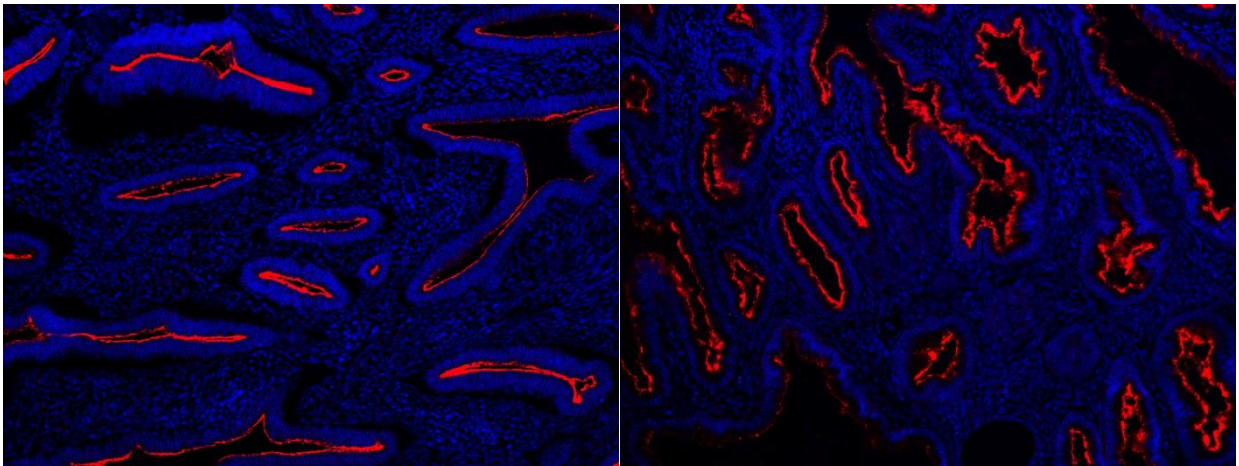


Рисунок 4.1 – Нормальний ендометрію. Імунофлуоресцентне забарвлення (CEACAM1 - червоний, DAPI - синій). Збільшення x200

У міру дедиференціювання неоплазій (зникнення залозистих формувань та наростання солідних ділянок) відбувалося як зникнення CEACAM1 з поверхні клітин, так і вогнищева їх експресія у цитоплазмі пухлинних клітин (рис. 4.2).

Для серозних та світлоклітинних ендометріальних карцином були влістиві всі чотири варіанти експресії CEACAM1 рецепторів: апікальний патерн, по всій мембрані, цитоплазматичний патерн та відсутність CEACAM1 у пухлинних клітинах (рис. 4.3). Як і у нормальній тканині CEACAM1 експресія окремими судинами та лейкоцитами були внутрішнім контролем якості імуногістохімічного дослідження.

Щодо CEACAM5 та CEACAM6 рецепторів, то результати виявилися наступними – лише окремі випадки ендометріюїдних карцином мали фокусну мембранно-цитоплазматичну експресію CEACAM5 та CEACAM6 рецепторів, окремі випадки серозних та світлоклітинних карцином були CEACAM5 та CEACAM6 позитивними (рис. 4.4).

Експресія CEACAM6 виявлена лише за умови експресії CEACAM1 рецепторів – CEACAM6 рецептори ніколи не експресувалися CEACAM1 негативною пухлинною тканиною. До того ж CEACAM5 експресія спостерігалась виключно у частини CEACAM6 позитивних епітеліальних

клітин. Лейкоцити з CEACAM6 рецепторами були позитивним внутрішнім контролем для anti-CEACAM6 мишачих mAb 1H7-4B у пухлинній тканині.

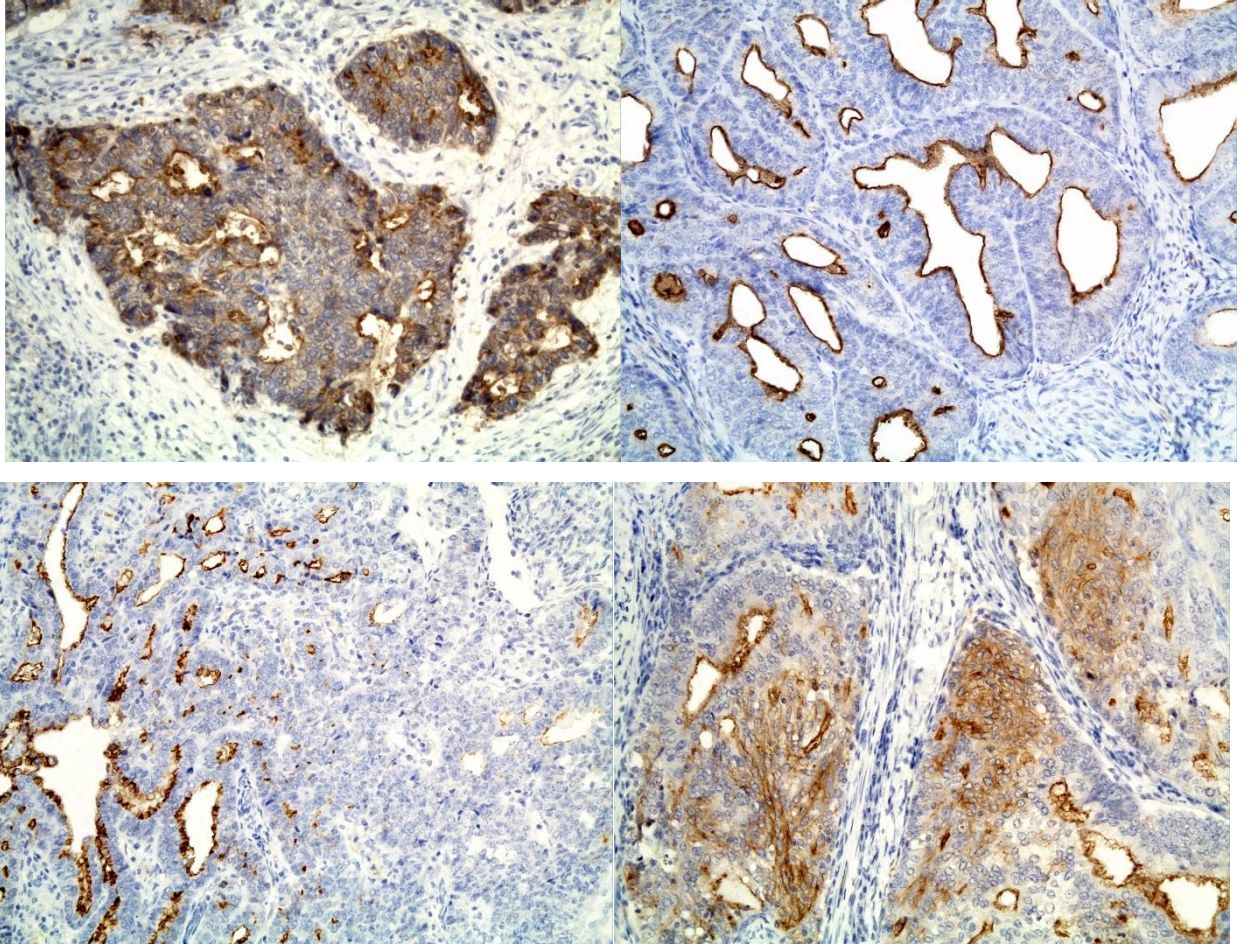


Рисунок 4.2 – Ендометріальна карцинома. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до CEACAM1. Збільшення x200

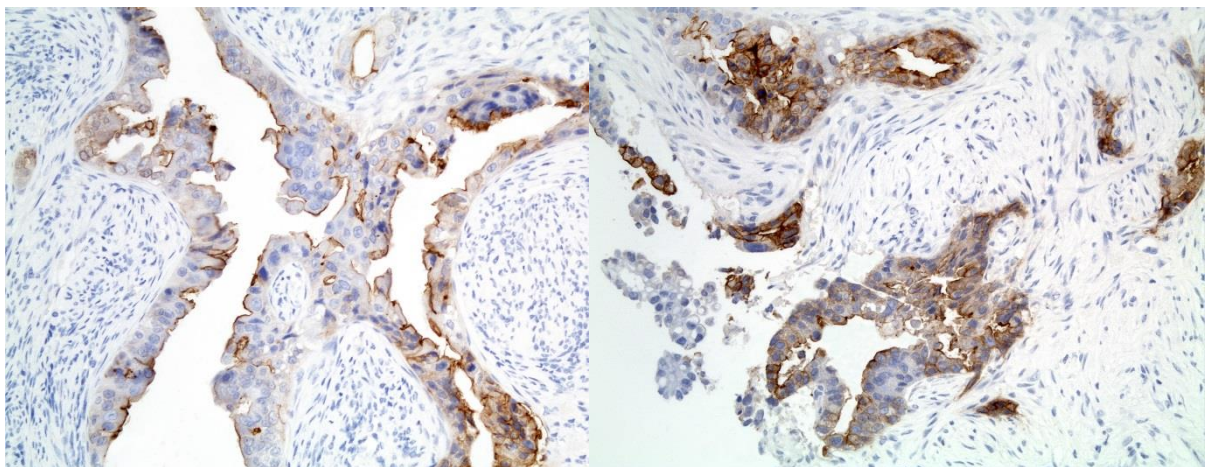
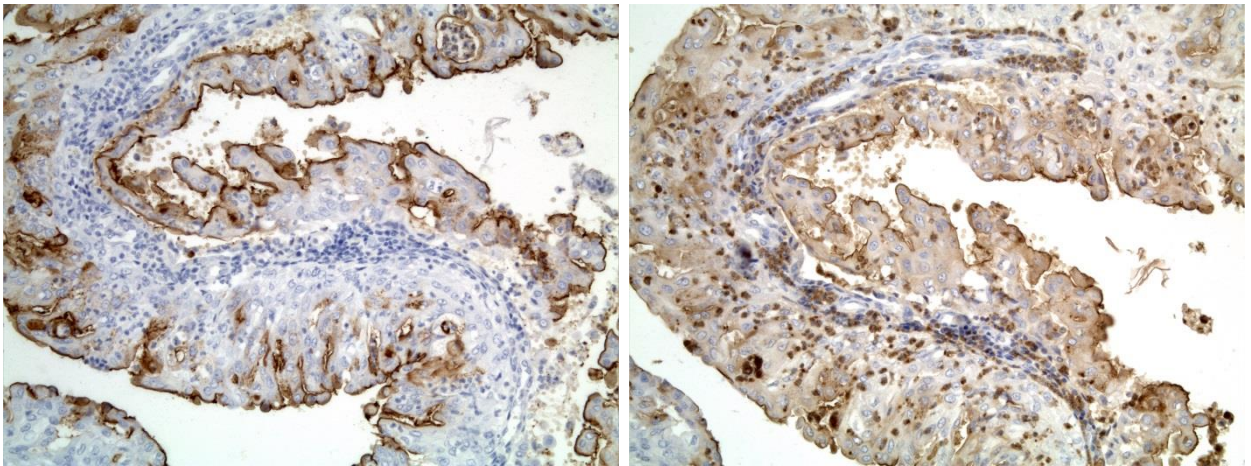


Рисунок 4.3 – Серозна ендометріальна карцинома. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до CEACAM1. Збільшення x200



А

Б

Рисунок 4.4 – Серозна ендометріальна карцинома. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до CEACAM5 (А) та до CEACAM6 (Б). Збільшення x200

Враховуючи епізодичність експресії CEACAM5 та CEACAM6 рецепторів епітеліальними клітинами нормального та пухлинного ендометрію, можливості встановлення їх участі у гормональній та проліферативній активності клітин ми не мали. Відповідно, всі подальші дослідження були направлені виключно на встановленні участі CEACAM1 у цих процесах.

Нормальний ендометрій характеризувався варіабельною експресією ER та PR на різних стадіях менструального циклу як у епітеліальних клітинах, так і стромі. Відбувається поступове пригнічення їх експресії покровними та залозистими клітинами ендометрію у стадії секреції. Загалом, основні особливості чутливості ендометрію до статевих гормонів протягом менструального циклу відповідали даним, отриманими Godinjak Z. та Bilalovic N.

Ендометріюїдні карциноми у всіх випадках були стероїд-позитивними. Спостерігалась тенденція до зменшення інтенсивності експресії ER та PR в окремих ділянках солідної будови карцином та у міру прогресування поліморфізму неопластичних клітин. Серозні та світлоклітинні ендометріальні карциноми мали менший ступінь вираженості ER та PR –

виявлено вогнищеву їх експресію у частини серозних пухлин, всі світлоклітинні карциноми були стероїд-негативними. Слід зазначити, що незалежно від чутливості пухлинних клітин до естрогену та прогестерону, стромальний компонент новоутворення та навколишня інтактна тканина ендометрію та міометрію у більшості випадків експресували ER та PR.

Нормальний ендометрій мав різну кількість епітеліальних клітин у стані поділу (з наявністю експресії рецепторів Ki-67) у різні фази менструального циклу. Для фази проліферації притаманні значно вищі показники проліферативної активності клітин (у середньому 18,5%), порівнюючи зі стадією секреції (у середньому 3,5%). У обох фазах циклу виявлено «гарячі» (групи клітин з високою проліферативною активністю) та «холодні» (ділянки з низькою проліферативною активністю клітин) вогнища.

Відсоток клітин з експресією Ki-67 у ендометріальних карциномах значно переважав показники інтактною тканини, хоча проліферативна активність у деяких low-grade ендометриодних карциномах була наближена до інтактного ендометрію стадії проліферації. Відзначено наростання кількості Ki-67 позитивних пухлинних клітин у міру дедиференціювання неоплазій, особливо у солідних ділянках карцином. Серозні та світлоклітинні ендометріальні карциноми постійно мали високі показники проліферативної активності (у середньому 35 та 45% відповідно). Слід зазначити, що окрім епітеліальних клітин (нормальні та пухлинні) у препаратах завжди було виявлено проліферуючі стромальні ендометріальні клітини, інколи їх проліферативна активність була навіть вищою.

Серійні зрізи нормальної та пухлинної тканини ендометрію дозволили встановити особливості ко-експресії CEACAM1 та рецепторів до статевих стероїдних гормонів. У досліджених зразках не виявлено взаємозв'язок між експресією вищезазначених рецепторів. По-перше, як стероїд-позитивний, так і стероїд-негативний нормальний ендометрій (у різні фази менструального циклу) завжди мав суцільну експресію CEACAM1 на апікальній поверхні епітеліальних клітин (рис. 4.5). По-друге, у частини

ендометріюїдних карцином з монотонною позитивною експресією ER and PR (з 100% рецептор-позитивних клітин) спостерігалась гетерогенна експресія SEASAM1 (рис. 4.6). По-третє, деякі випадки серозної та світлоклітинної ендометріальних карцином з відсутньою експресією ER та PR мали вогнищеву позитивну експресію SEASAM1.

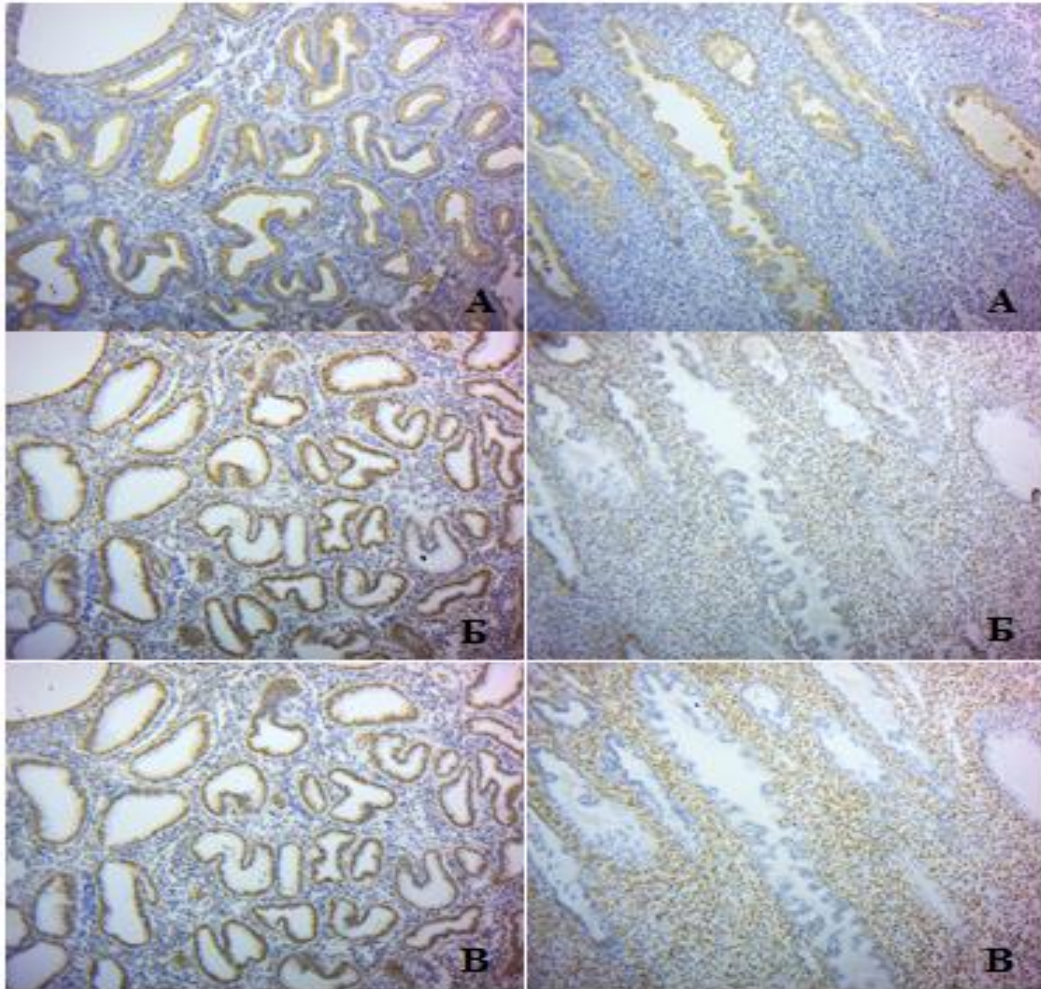


Рисунок 4.5 – Нормальний ендометрій. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до SEASAM1 (А), ER (Б) та PR (В). Збільшення x100

Досліджуючи нормальний ендометрій на предмет наявності взаємозв'язку між проліферативною активністю клітин та експресією SEASAM1, нам не вдалося виявити їх взаємовпливу. Це пов'язано з рідкістю розташування проліферуючих клітин. Натомість, повністю протилежні результати було отримано при аналізі імуногістохімічного дослідження серійних зрізів тканини ендометріальних карцином.

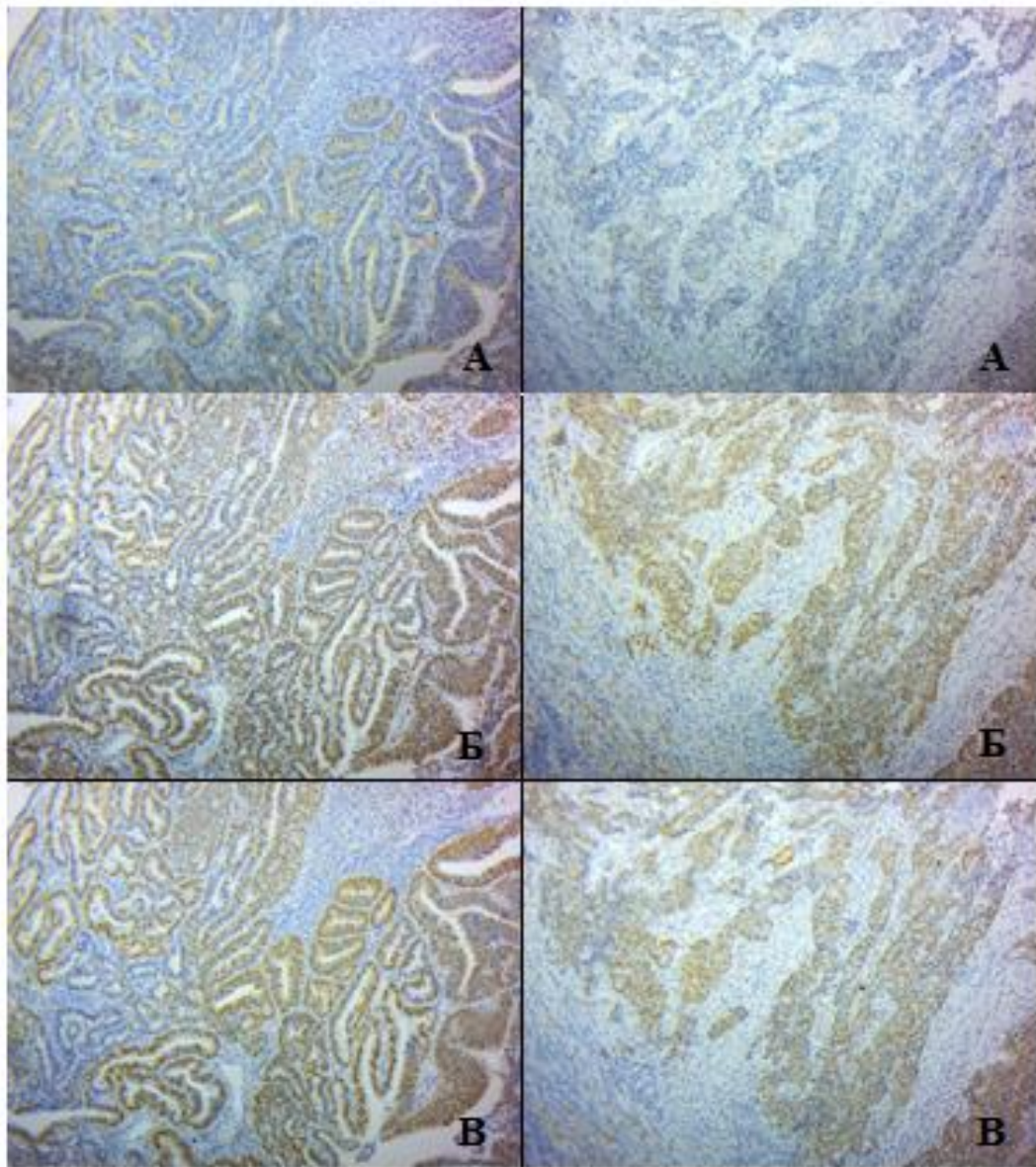


Рисунок 4.6 – Ендометріальна карцинома. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до SEASAM1 (А), ER (Б) та PR (В). Збільшення x100

Вогнища неоплазій з експресією SEASAM1, незалежно від їх патерну у клітинах, мали значно нижчі показники інтенсивності поділу ракових клітин (менший відсоток Ki-67 позитивних клітин) (рис. 4.7).

Серед SEASAM1 позитивних випадків найнижчі показники проліферативної активності було виявлено за умови апікальної їх експресії. Ключові підтверджуючі результати було отримано при дослідженні гетерогенної (щодо експресії SEASAM1) неопластичної тканини.

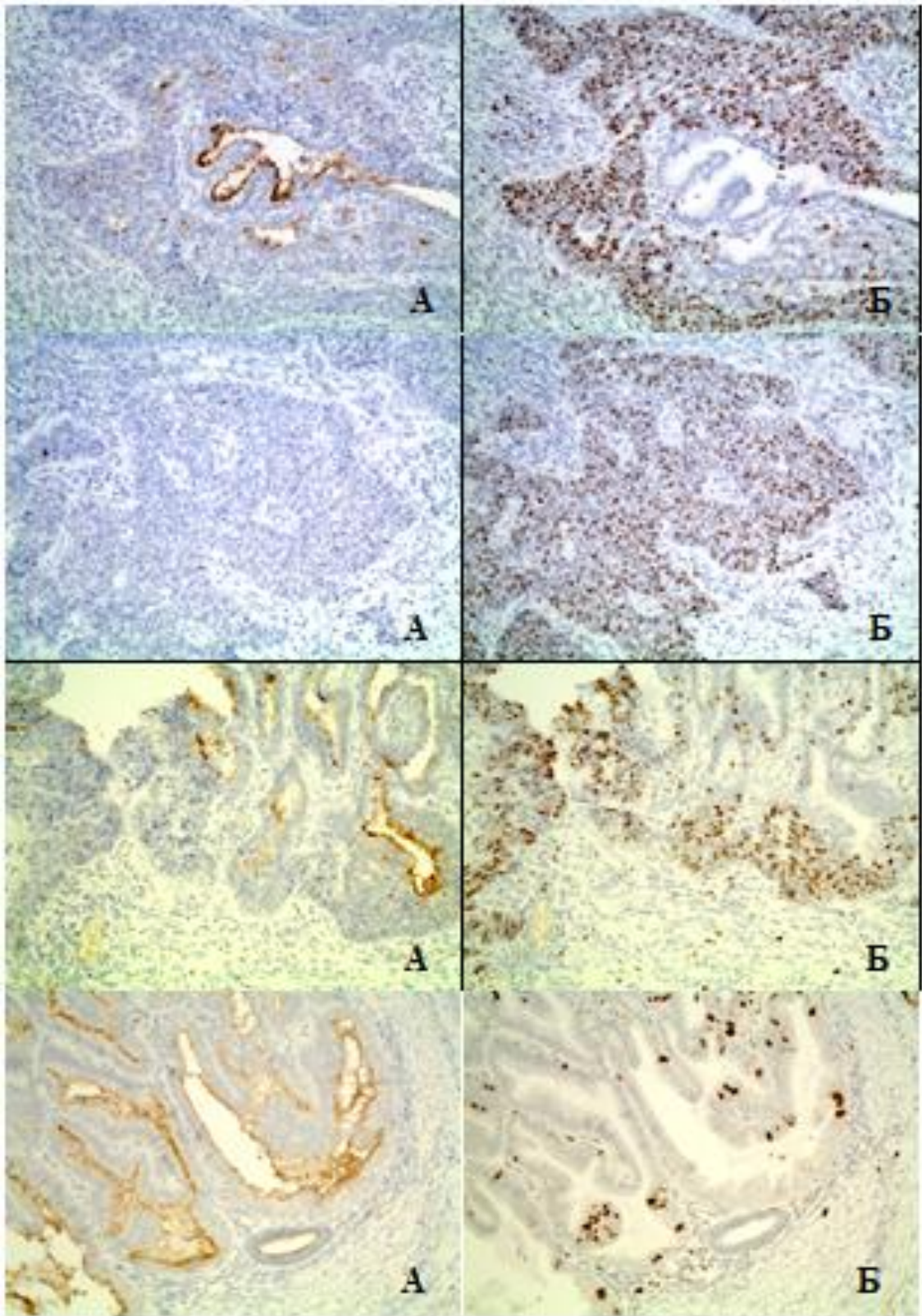


Рисунок 4.7 – Ендометріальна карцинома. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до CEACAM1 (А) та Ki-67 (Б). Збільшення xБ00

Кількість Ki-67 позитивних клітин була значно більшою у ділянках без експресії CEACAM1. Остаточно інгібуючий вплив CEACAM1 на проліферативну активність неопластичних клітин був доведений при double immunofluorescence staining з використанням мишачих anti-CEACAMs та кролячих anti-Ki-67 mAbs (рис. 4.8). «Гарячі» проліферативні ділянки ендометріальних карцином були CEACAM1 негативними, у порівнянні з «холодними» вогнищами пухлини, які у переважній більшості експресували CEACAM1.

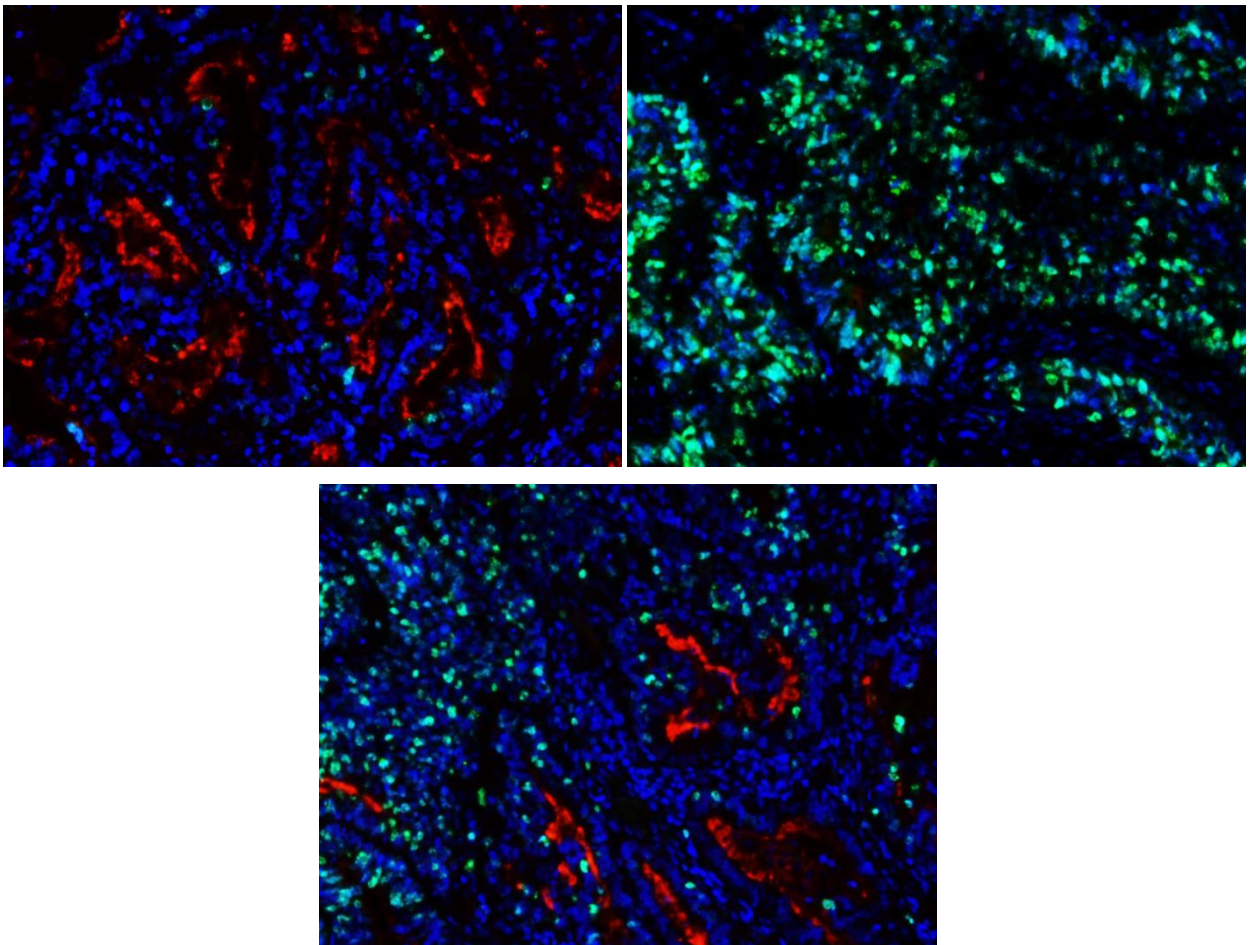


Рисунок 4.8 – Ендометріальна карцинома. Подвійне імунофлуоресцентне забарвлення (CEACAM1 - червоний, Ki-67 - зелений, DAPI - синій).

Збільшення x200

5 УЧАСТЬ SEACAM1 У ФУНКЦІОНУВАННІ СУДИН

Процеси утворення судин *de novo* із клітин-попередників мезодерми (васкулогенез) та нових із судин, що вже існували (ангіогенез) мають вирішальне значення у розвитку ембріона, зростанні та функціонуванні тканин, прогресуванні пухлини тощо. На них впливають різні ендогенні та екзогенні фактори. SEACAM1 є одним із ангіотропних білків. Незважаючи на різноманітність даних про його функцію в епітеліальних клітинах, точна їх роль у судинах та існуванні ендотелію досі незрозуміла.

Встановлено, що кількість SEACAM1-позитивних судин збільшується при інтраепітеліальних новоутвореннях передміхурової залози (78,4% CD34-позитивних судин) та у солідних пухлинах (50,8%). Ті самі результати були описані під час неопластичної трансформації в уротелії сечового міхура. SEACAM1 експресується ендотеліальними клітинами семіноми, тоді як вони відсутні в нормальній тканині яєчок та придатків яєчка. У переважній більшості цих та інших досліджень було вказано на їх проангіогенну активність внаслідок активації судинного ендотеліального фактора росту (VEGF). SEACAM1 індукує експресію VEGF в ендотеліоцитах, посилюючи проліферацію, хемотаксис та утворення капілярної трубки. Завдяки цим функціям SEACAM1 (SEACAM1-L) бере участь у прогресії пухлини, модулюючи неоваскуляризацію новоутвореної тканини. Більше того, ангіогенно активовані лімфендотеліальні клітини експресують значно більшу кількість рецепторів SEACAM1, ніж клітини гемендотелію. SEACAM1 знаходиться в незрілих дрібних кровоносних судинах пухлинної тканини при майже всій їх відсутності в нормальних тканинах.

Крім цього вони опосередковують ремоделювання судин, регулюють цілісність та проникність судин. Проникнення компонентів крові у нульових тварин SEACAM1 було посилене завдяки збільшенню АКТ та активації ендотеліальної NO-синтази з підвищенням продукування NO. У деяких випадках невідповідність їх активності проникності пояснюється

можливостями SEACAM1 утворювати димери (гомо- або гетеродимери). Отже, різні композиції SEACAM1 відповідають за різноманітні молекулярні каскади. Іншим напрямком їх бар'єрної дії на кров'яноктинні тканини є інгібування MMP-9 у нейтрофілах. Підвищення рівня MMP-9 було встановлено у нейтрофілах з дефіцитом SEACAM1, що супроводжується підвищенням проникності крові та мозку. Ці результати дозволяють припустити, що SEACAM1 є однією з частин гемато-тканинного бар'єру.

Вони також мають важливе значення у формуванні залозисто-каналцевого та судинного просвіту.

Різнманітність патологій супроводжується звуженням судин і, як наслідок, ішемічним ураженням тканин. SEACAM1 бере участь у захисних механізмах проти гіпоксичного руйнування життєво важливих органів. З одного боку, завдяки індукції синтезу eNOS, GSK3, FoxO, Akt, NADPH та інших ферментів вони призводять до вазорелаксації. З іншого боку, ішемічне пошкодження індукує VEGF і TNF- α . TNF- α активує NF κ B, який разом з VEGF та SEACAM1 стимулює утворення колатералів, що веде до зменшення гіпоксичної та запальної реакції.

Незважаючи на підтвержені дані про SEACAM1 як адгезивних молекулах, було отримано докази щодо їх антиадгезивних властивостей у кровоносній судині завдяки індукційній адгезії молекули-1 судинних клітин. На противагу цьому, SEACAM1 може впливати на фосфорилування молекул спайових адренсів (VE-кадгерин та β -катенін), що призводить до зміни властивостей адгезії клітин ендотелію.

Матеріали і методи

Зразки тканин

Особливості експресії SEACAM1 у дорослих досліджено на наступних видах тканин від 5 осіб: мозку, мозочка, селезінки, тимусу, лімфатичних вузлів, шлунку, кишечника, печінки, жовчного міхура, підшлункової залози, нирки, сечовий міхур, простата, яечник, яечка, придатки яечка, молочна залоза, матка, маткові труби, наднирники, щитовидна залоза, легені, серце,

шкіра та інших органів. Взаємозв'язок між проявом CEACAM1 в ендотеліальних клітинах та пухлинною трансформацією вивчали на різних новоутворених тканинах передміхурової залози (10 зразків), які видаляли хірургічним шляхом. Для встановлення участі CEACAM1 у внутрішньоутробному періоді ми вивчили 3 випадки ембріональної тканини (шлунок, тонка та товста кишка).

Імуногістохімічне дослідження

Після гістологічного дослідження зразків, забарвлених гематоксилін-еозином, з вивченням їх загальної будови парафінові блоки використовували для імуногістохімічного дослідження. Серійні зрізи 5 мкм виконувались і встановлювались на предметних скельцях, покритих 3-амінопропілтріетоксисиланом. Після експозиції в термостаті (57⁰C) протягом ночі зразки тканин депарафінізували в ксилолі та спиртах градуйованої концентрації. Теплоопосередковане демаскування антигену проводили за допомогою водяної бані та 0,01 М цитрату натрію протягом 30 хвилин при 97⁰C. Ендогенну пероксидазну активність блокували обробкою в «UltraVision Hydrogen Peroxidase Block» («Thermo Scientific») протягом 10 хвилин з подальшим промиванням сольовим розчином, забуференого фосфату (PBS, рН 7,3). Фонове фарбування, потенційно спричинене неспецифічним зв'язуванням білків-антитіл, запобігали інкубацією з "UltraVision Protein Block" протягом 5 хвилин. Наступним етапом була інкубація з первинним антитілом (30 хвилин) при кімнатній температурі. Вивчали наступну панель антитіл: mAb миші анти-CEACAM1 C5-1X/8 (Singer); всі судини візуалізували за допомогою мишачого анти-CD31 mAb 1A10 ("Bio-Rad"), лімфатичні судини – за допомогою мишачого антиподопланінового mAb 4D5aE5E6 ("Bio-Rad"); ендогенний вплив на ріст судин – за допомогою кролячого анти-VEGF pAb ("Thermo Scientific"). Після промивання та подальшого посилення сигналів за допомогою " Primary Antibody Amplifier Quanto " ("Thermo Scientific") наносили вторинне антитіло ("HRP Polymer Quanto" - "Thermo Scientific") та інкубували протягом 10 хвилин при

кімнатній температурі. Позитивні забарвлення візуалізували за допомогою діамінобензидину ("DAB Quanto" - "Thermo Scientific"), контролюючи інтенсивність сигналу за допомогою світлової мікроскопії. Згодом реакцію DAB зупиняли дистильованим H₂O, як тільки підтримувалася бажана інтенсивність кольору. DAB-негативні структури були виявлені шляхом додаткового контрзабарвлення гематоксиліном Майєра. Промивання в PBS проводили між усіма етапами імуногістохімічного дослідження.

Для контролю якості імуногістохімічного забарвлення використовували як негативні (заміщення первинних антитіл PBS), так і позитивні (фарбування раніше досліджених рецептор-позитивних тканин) контролю.

Оцінка забарвлення

Для виключення впливу одного дослідника всі зразки вивчали три незалежні патологи. Відсоток CEACAM1-, VEGF- та подопланін-позитивних судин підраховували шляхом порівняння їх кількості із CD31-позитивними структурами (експресія CD31 була показником присутності ендотеліоцитів).

Отримані імуногістохімічні зразки досліджували та фотографували за допомогою мікроскопа "Carl Zeiss Primo Star" (біокуляр $\times 10$, лінзи $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$) з цифровою камерою "Zeiss AxioCam ERs 5s" та програмним забезпеченням "ZEN 2".

Результати дослідження

Під час гістологічного дослідження зразків було встановлено, що всі органи дорослих мають типову нормальну будову. У них наявна різна щільність васкуляризації. Ми виявили всі види судин: дрібні артерії та вени, артеріоли, капіляри та венули. Дослідження CD31 дозволило виявити значно більшу кількість дрібних судин (капілярів), які були невидимі під час фарбуванні гематоксилін-еозином. Їх кількість залежала від типу досліджуваної тканини - розташування щільних судин у головному мозку, надниркових залозах, нирках, тимусі з рідкісним рівнем васкуляризації м'язової та жирової тканин (рис. 5.1-5.5).

СЕАСАМ1 у нормальних тканинах

Імуногістохімічне дослідження дозволило виявити наявність СЕАСАМ-позитивних судин в органах ендокринної системи (наднирковій та щитовидній залозах). Вони представлені венами, венулами та капілярами з повною відсутністю експресії СЕАСАМ1 в ендотеліальних клітинах артерій та артеріол. Слід зазначити, що майже всі судини (крім артеріальних) надниркових залоз були рецепторно-позитивними порівняно з рідкісним розташуванням у щитовидній залозі (рис. 5.1).

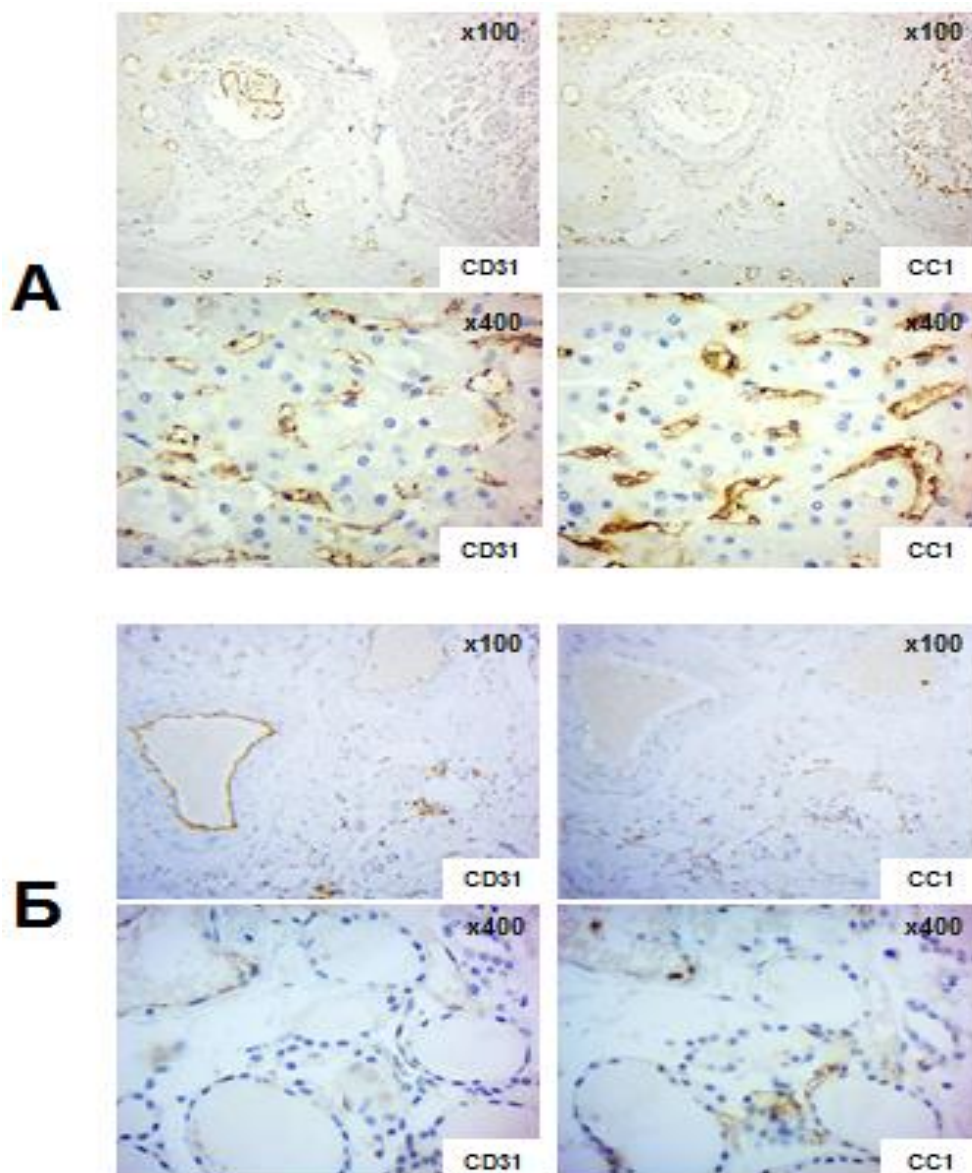


Рисунок 5.1 – Тканина надниркової та щитоподібної залоз. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до CD31 та СЕАСАМ1 (CC1). Збільшення x100 та x400

СЕАСАМ1-позитивні гранулоцити були знайдені (як активний позитивний контроль) у всіх зразках, навіть всередині рецептор-негативних судин.

Серед усіх лімфоїдних (селезінка, тимус, лімфатичний вузол) лише в селезінці СЕАСАМ1-позитивні судини не виявлено (рис. 5.2).

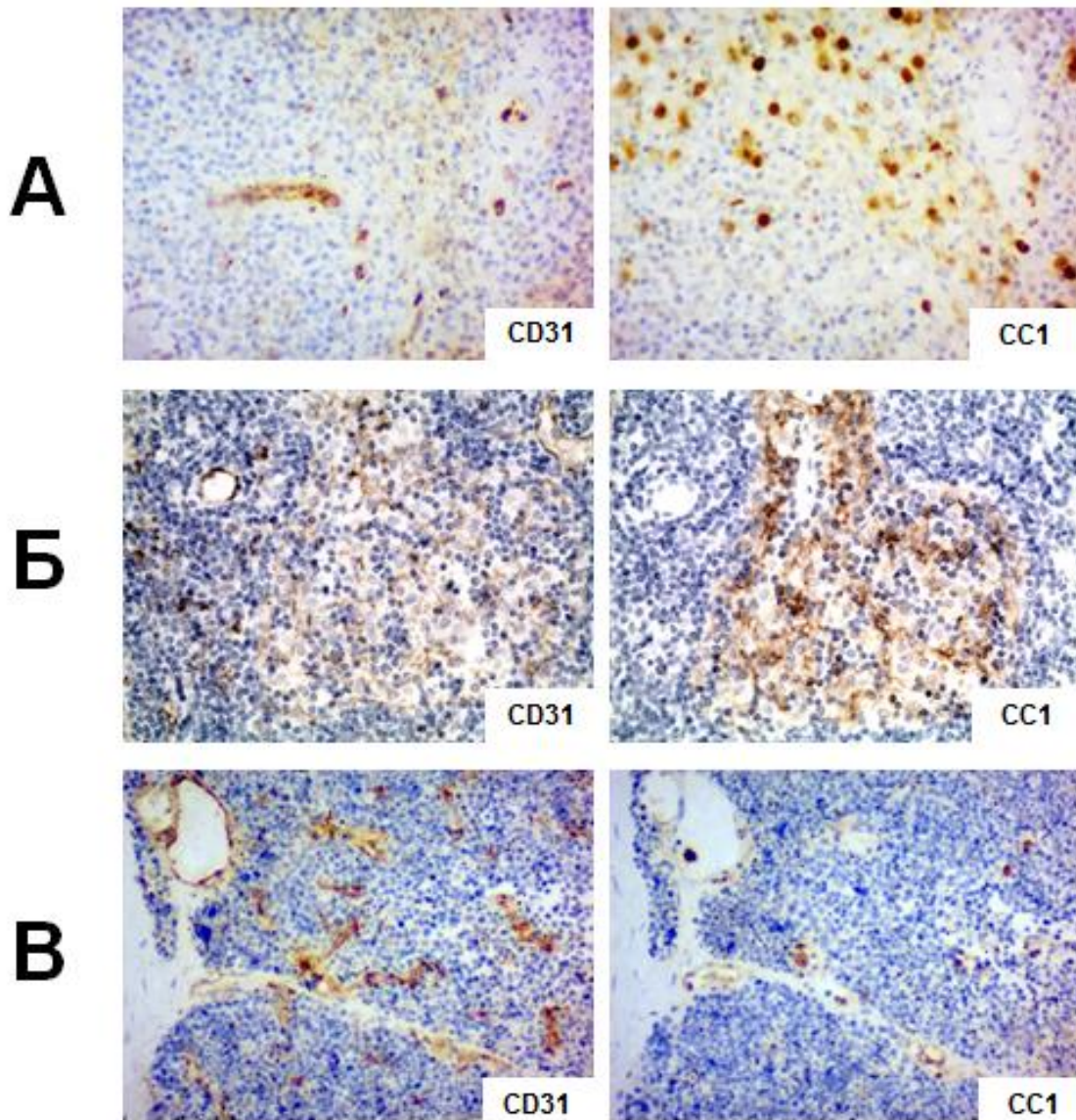


Рисунок 5.2 – Тканина селезінки (А), лімфатичного вузла (Б) та тимуса (В).

Імуногістохімічне дослідження рецепторів до CD31 та СЕАСАМ1 (CC1).

Збільшення x400

Експресія СЕАСАМ1 була виявлена виключно в ендотеліоцитах стромальної частини (капсули та перегородки) тимуса з їх відсутністю в

часточках (хоча ми виявили там високий рівень васкуляризації). Лімфатичні вузли характеризуються наявністю SEACAM1 на поверхні ендотеліальних клітин у субкапсулярних та медулярних синусах.

Наявна значна кількість SEACAM1-позитивних судин в тих органах, які мають прямий контакт із зовнішнім середовищем або речовинами, які виводяться назовні (шлунок, кишечник, сечовий міхур, легені, жовчний міхур). Окрім цього, у досліджених зразках виявлені різноманітні види інших гістологічних структур: поверхневі шари уротелію, епітелій пілоричних шлункових залоз, ентероцити та колоноцити кишечника, епітелій бронхів та бронхів. Серед цих органів лише паренхіма легенів (альвеолоцити) була SEACAM1-негативною.

Вивчаючи SEACAM1 в секретуючих органах (печінка, підшлункова залоза, нирки), ми встановили різну кількість рецептор-позитивних судин - майже 100% тонкостінних судин (крім артерій) у нирках та одиничних судинах у печінці та підшлунковій залозі (рис. 5.3). Клітини проксимальних каналців нирок, епітелій проток підшлункової залози та гепатоцити з клітинами жовчних каналів печінки мали на своїй поверхні рецептори SEACAM1.

В органах репродуктивної системи (простаті, яєчках, придатках яєчника, яєчниках, молочній залозі, матці та матковій трубі) частина судин також була SEACAM1-позитивною (рис. 5.4). Також було багато рецептор-позитивних структур (апикальна частина клітин): просвітні епітеліальні (протокові та часточкові) клітини молочної залози, залозистий епітелій передміхурової залози, ендосальпінкс, ендометрій та клітини придатків. Слід зазначити, що гранулоцити були позитивними (контроль) як у рецептор-позитивних, так і в рецептор-негативних судинах.

Незважаючи на присутність SEACAM1 в ендотеліальних клітинах різних органів, багато з них не мають жодної судини з SEACAM1 у своїй структурі. Слід зазначити, що в цих органах SEACAM1 відсутній у будь-

яких інших структурах. Мозок, мозочок, жир, серце та м'язи є CEACAM1-негативними (рис. 5.5).

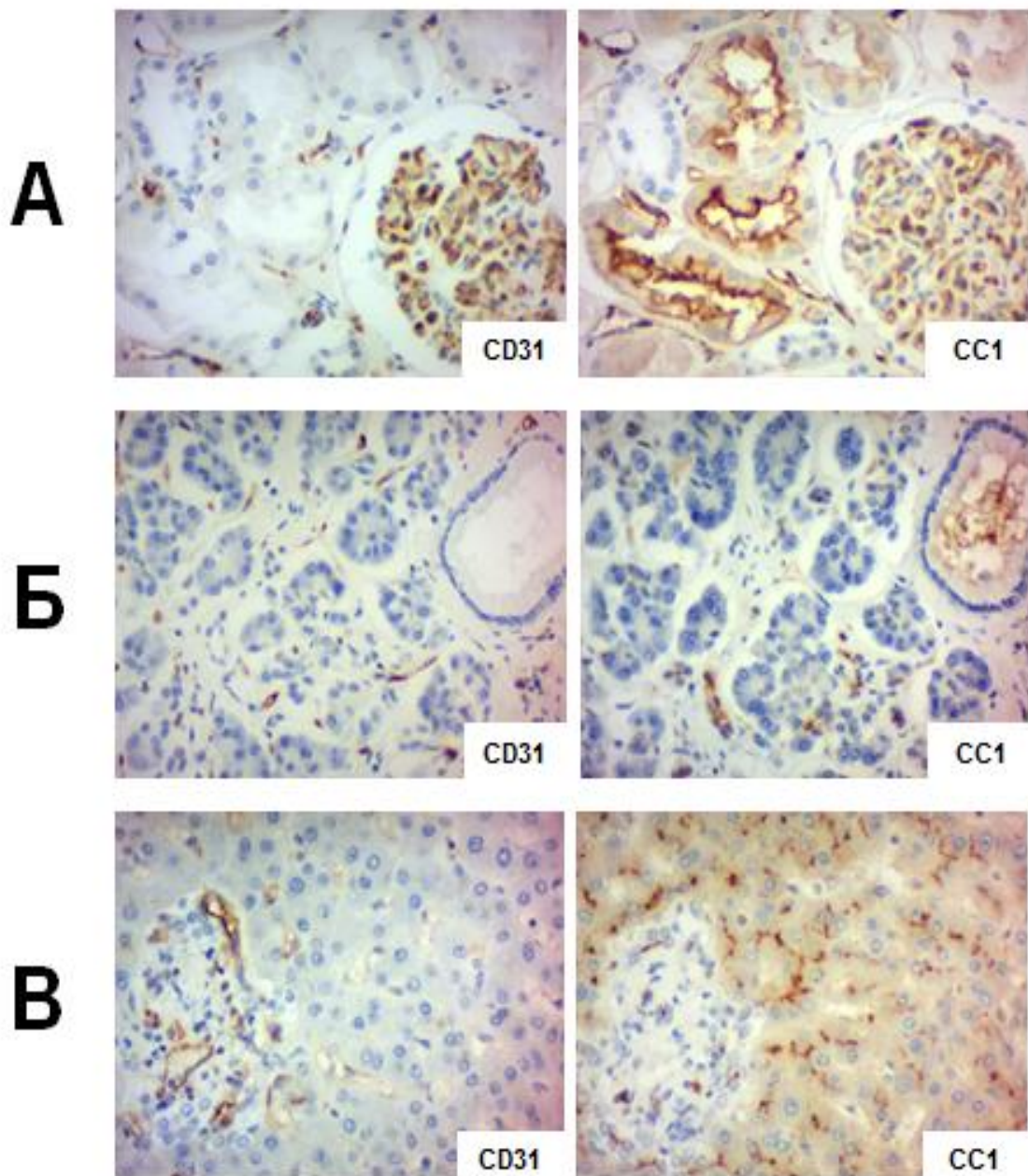


Рисунок 5.3 – Тканина нирок (А), підшлункової залози (Б) та печінки (В). Імуногістохімічне дослідження рецепторів до CD31 та CEACAM1 (CC1).

Збільшення x400

Аналіз усіх випадків від різних людей дозволив виявити змінну кількість CEACAM1-позитивних судин у кожної людини та кожному органі.

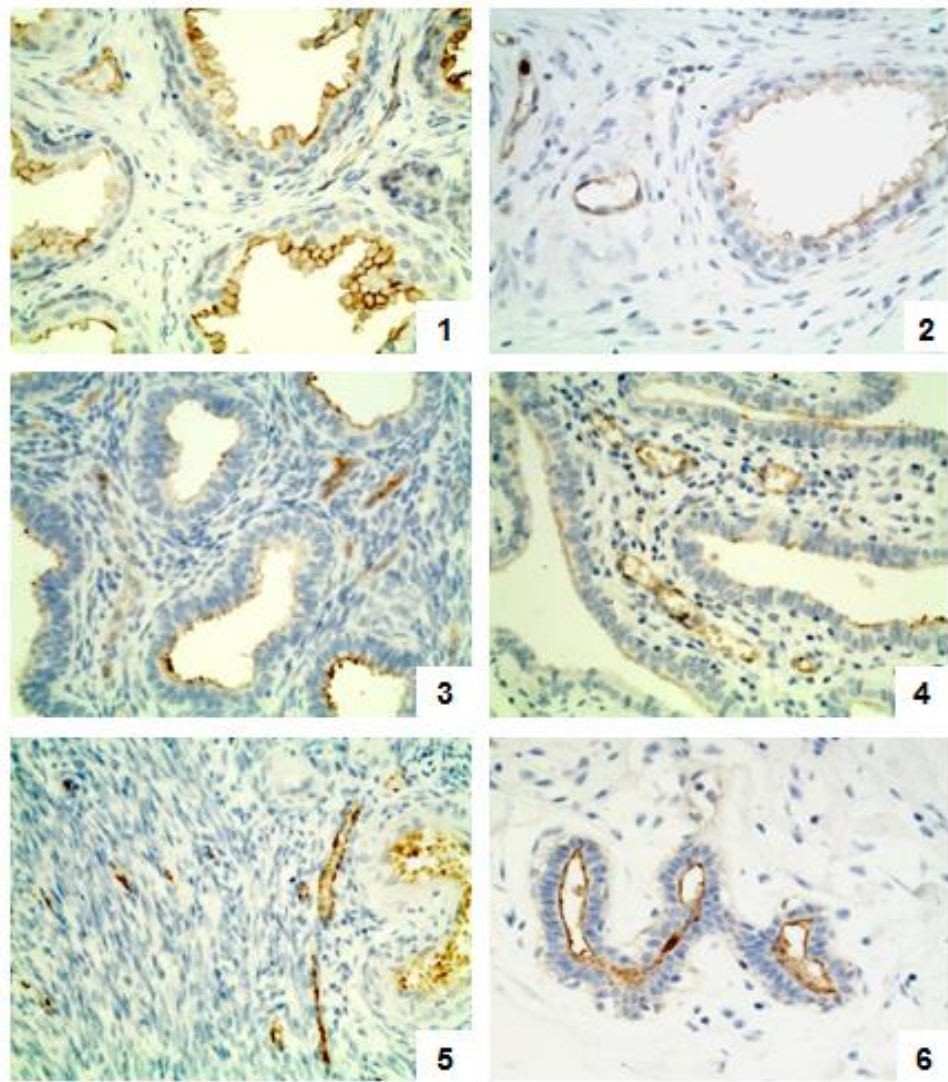


Рисунок 5.4 – Тканина простати (1), надяєчка (2), матки (3), маткової труби (4), яєчника (5) та молочної залози (6). Імуногістохімічне дослідження рецепторів до SEASAM1. Збільшення x400

Дослідження участі SEASAM1 в ангіогенезі

Беручи до уваги інформацію про експресію SEASAM1 виключно в судинах, що ростуть, ми провели імуногістохімічне фарбування новоутвореної тканини передміхурової залози, шкіри з грануляційним ростом та ембріональної тканини (тонка і товста кишка, шлунок). Ангіогенез (утворення нових судин) відбувається тут постійно. Ми виявили, що в раковій тканині передміхурової залози, як і в нормальній тканині, лише частина судин є SEASAM1-позитивною (рис. 5.6-А).

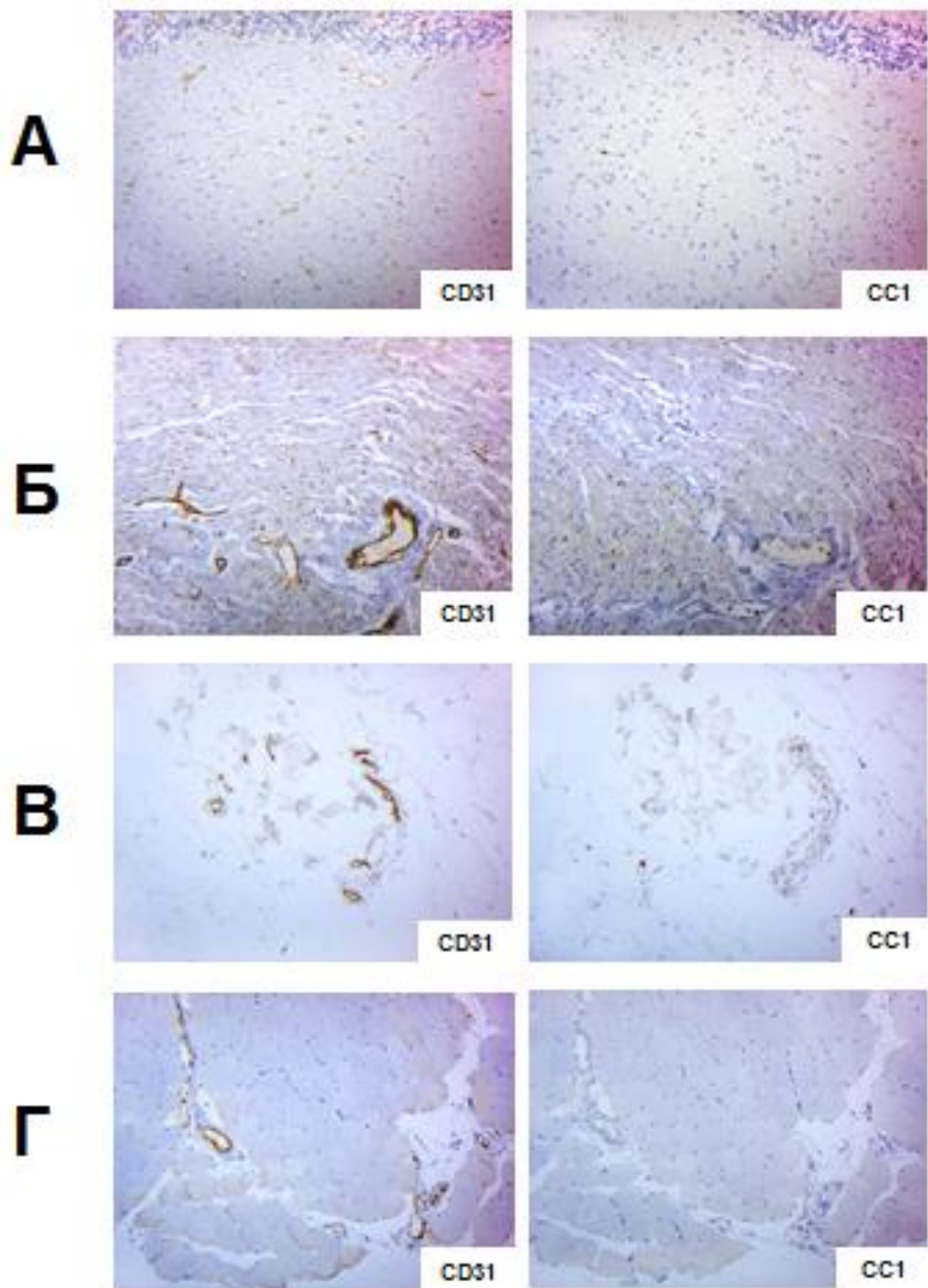


Рисунок 5.5 – Тканина мозку (А), серця (Б), жирової (В) та м'язевої (Г) тканин. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до CD31 та CEACAM1 (CC1). Збільшення x100

Дивно, але в грануляційній тканині лише невелика кількість тонкостінних судин мала рецептори в ендотеліоцитах (рис. 5.6-Б). У

стромальній частині ембріональної тканини були присутні як SEASAM1-позитивні, так і SEASAM1-негативні судини (рис. 5.6-В). Подібно до нормальних зразків дорослих, в ембріональних тканинах шлунково-кишкового тракту виявлені SEASAM1-позитивні структури (апикальна поверхня залозистих клітин). Додатково було помічено їх присутність у цитоплазмі ембріональної тканини.

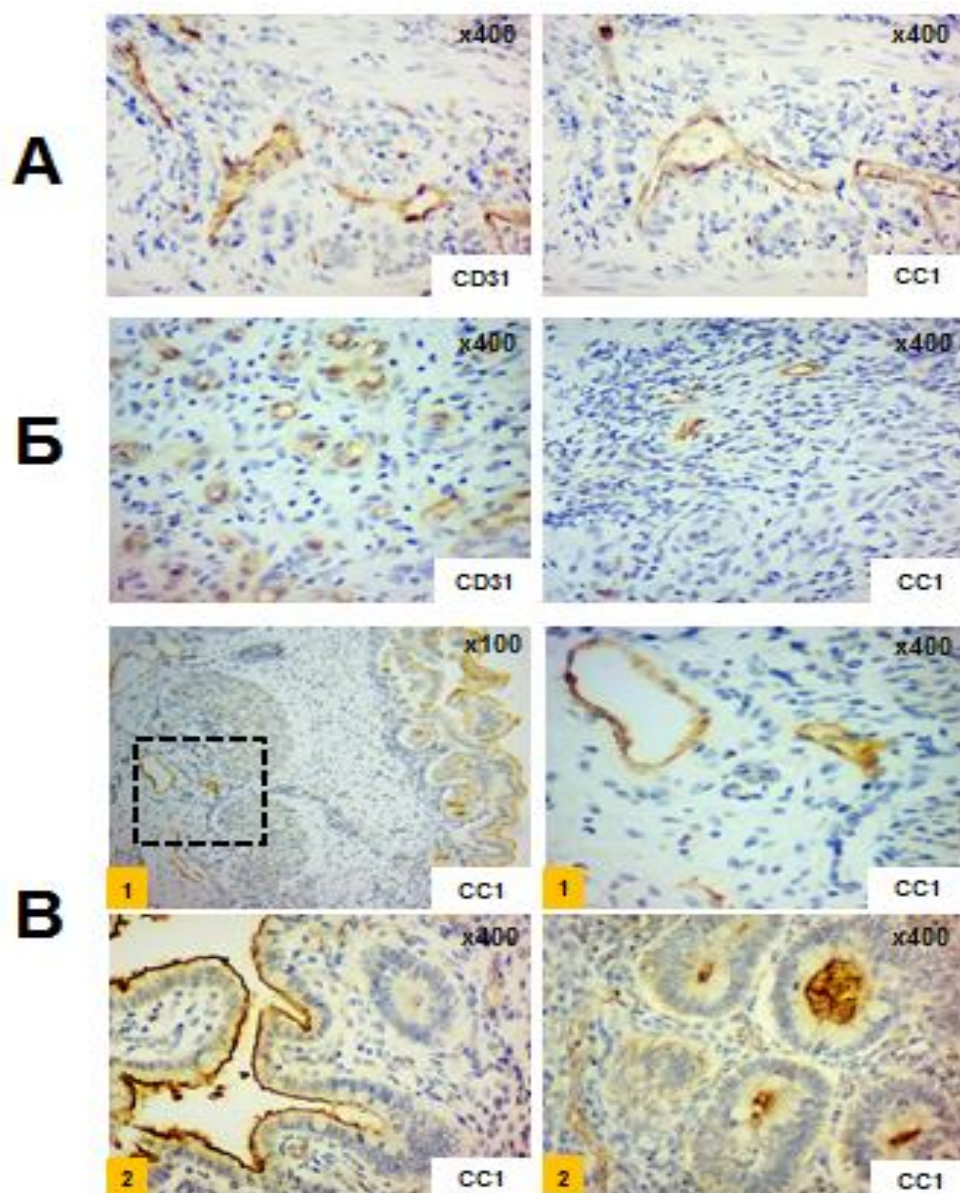


Рисунок 5.6 – Дослідження SEASAM1 у тканинах, що ростуть.

Тканина раку простати (А), грануляційна тканина шкіри (Б) та ембріональна тканина (В): 1) шлунок, 2) тонкий кишківник, 3) товстий кишківник. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до CD31 та SEASAM1 (CC1). Збільшення x100 та x400.

Вивчення експресії SEACAM1 в лімфатичних та VEGF-активованих судинах.

Лімфатичні судини (подопланін-позитивні) були розташовані в різній пропорції серед CD31-позитивних структур, як в нормі, як і в злоякісних тканинах передміхурової залози (рис. 5.7), але їх щільність була вищою в неопластичних зразках порівняно з інтактною тканиною.

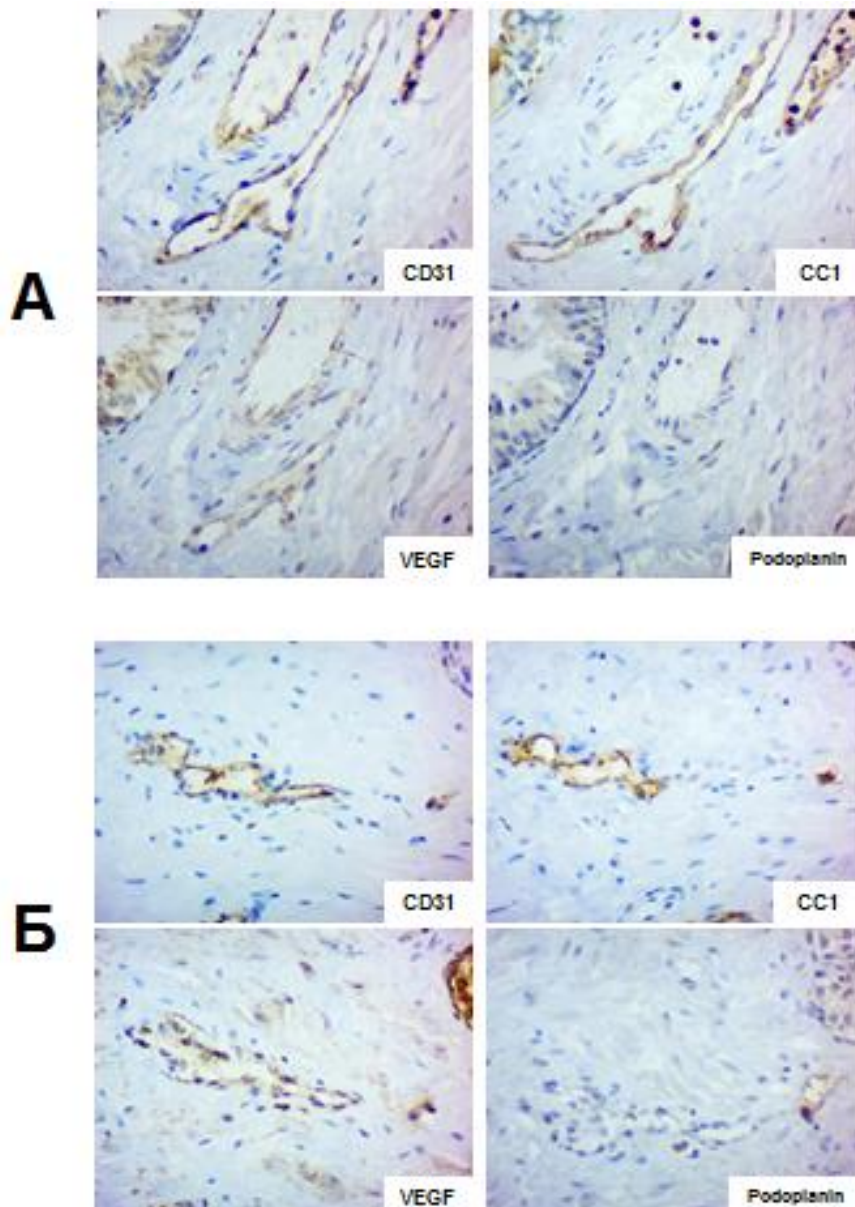


Рисунок 5.7 – Тканина простати. А – Експресія SEACAM1 у частини VEGF-активованих судин. В – Експресія SEACAM1 у всіх VEGF-активованих судинах. Імуногістохімічне дослідження рецепторів до CD31, SEACAM1 (CC1), VEGF та подопланіну. Збільшення x400.

Серійні зрізи дозволили ідентифікувати в них рецептори CEACAM1. Ми виявили, що незалежно від трансформації пухлини існували як CEACAM1-позитивні, так і CEACAM1-негативні лімфатичні судини. Частка CEACAM1-позитивних лімфатичних судин була вищою, ніж їх кількість серед усіх інших видів судин (ідентифікованих CD31). Більш того, наявність експресії CD31 у судинах, негативних до подопланіну, дозволило ідентифікувати венули серед тонкостінних судин (додатково це було підтверджено наявністю в них еритроцитів, яких не було в лімфатичних структурах).

Теорію коекспресії VEGF та CEACAM1 вивчали на нормальних та злоякісних випадках тканин передміхурової залози. У тканинах передміхурової залози ми виявили головним чином VEGF-позитивні ендотеліоцити у всіх видах (тонких та товстих стінок) судин (рис. 5.7), але також були одиночні VEGF-негативні судини. Експресія CEACAM1 була ідентифікована переважно у VEGF-позитивних судинах, хоча деякі з VEGF-негативних були також позитивними та негативними. Змінна цитоплазматична експресія рецепторів VEGF розташовувалася в просвітних клітинах простати. Їх інтенсивність залежала від виду тканини (нормальної чи злоякісної) та ступеня злоякісності раку.

Слід зазначити, що експресія CEACAM1 не залежала від статі (крім органів репродуктивних тканин) та віку більшості досліджуваних тканин.

Обговорення результатів

Функціонування організму супроводжується постійним збільшенням всіх органів, тканин і клітин, оновленням, перебудовою їх структури. Всі ці процеси підтримуються утворенням нових судин (ангіогенезом) під контролем їх проникності та поширення. Ендотеліоцити - це ті елементи судинної стінки, які відповідають за більшу частину функцій. Через їх специфічні молекулярні особливості вони контролюються загальними (нервовими та гормональними) та паракринними стимулами. Однією з

нещодавно знайдених молекул на ендотеліоцитах є SEACAM1, який був описаний у багатьох органах людини в нормальних та патологічних станах.

Незважаючи на інформацію про експресію SEACAM1 на ендотеліальних клітинах виключно в новоутворених тканинах, ми знайшли багато нормальних органів (незалежно від статі та віку) у дорослих з SEACAM1-позитивними судинами. До них відносяться: тимус, лімфатичні вузли, шлунок, кишечник, печінка, підшлункова залоза, нирки, сечовий та жовчний міхури, простата, придатки яєчника, яєчник, яєчка, молочна залоза, матка, маткова труба, наднирники, щитовидна залоза, легені та шкіра. Мозок, мозочок, селезінка, жир, серце та м'язова тканина не включали жодної SEACAM1-позитивної судини. Встановлено, що щільність та кількість їх залежали від типу органу та рівня васкуляризації (CD31-позитивні структури). Невелика кількість судин, що містять SEACAM1, була показана в молочних залозах, тимусі, печінці, підшлунковій залозі, щитовидній залозі та шкірі. Тоді як у кишечнику, нирках, сечовому міхурі, простаті, матковій трубі, надниркових залозах та легенях наявна значно більша кількість SEACAM1-позитивних судин.

Поглиблений аналіз гістологічних та імуногістохімічних зразків дозволив виявити присутність SEACAM1 виключно на ендотеліоцитах тонкостінних судин – судини з більш товстою стінкою (артерії) були SEACAM1-негативними. Серед тонкостінних судин як венули (подопланін-негативні структури, що містять усі види формених елементів крові), так і капіляри (судини діаметром менше 10 мкм, які представлені лише ендотеліоцитами), а також лімфатичні судини (подопланін-позитивні, що містять поодинокі лімфоцити), лише частина з них була SEACAM1-позитивною. Переважання експресії SEACAM1 у лімфатичних судинах підтверджує дані про значно більшу кількість рецепторів SEACAM1 у клітинах лімфендотелію, ніж у клітинах гемендотелію, які були знайдені в лініях культури клітин.

Спроби розділити всі органи на групи, що стосуються присутності SEASAM1 в їх судинах, мали різні результати. Спочатку ми ідентифікували SEASAM1-позитивні органи (з SEASAM1 в ендотеліальних клітинах) як ті, що були ендокринними, органами із залозистою тканиною або безпосереднім контактом із зовнішнім середовищем. Замість цього м'язеві, нервові та жирові тканини, а також селезінка були SEASAM1-негативними (без SEASAM1 в ендотеліальних клітинах). Ця класифікація підходить для всіх органів, крім тимусу та лімфатичних вузлів (вони є SEASAM1-позитивними), хоча і не мають цих особливостей.

Поділивши органи на дві групи за контактами доступності з навколишнім середовищем або виділеними рідинами, ми зіткнулися з іншою загадкою - деякі органи з відсутнім контактом з навколишнім середовищем (тимус, лімфатичні вузли, наднирники та щитовидна залоза) мали SEASAM1 на поверхні ендотеліоцитів. Також яєчник не може бути включений в жодну з цих груп - з одного боку, він має непрямий контакт з навколишнім середовищем через маткову трубу, з іншого боку, цей контакт зник після видалення матки або облітерації труби.

Наступним кроком було групування органів за наявністю SEASAM1 у їх структурі (крім судин). Але в цьому випадку були пропущені надниркові та щитоподібні залози, а також яєчники та яєчка, які не мали цих рецепторів у жодному з компонентів своєї нормальної структури. Лейкоцити лімфатичних вузлів і селезінки, з одного боку, є компонентами їх нормальної будови; з іншого боку, вони присутні у всіх органах як складові їх стромального компоненту.

Нарешті, ми розділили всі органи на два типи - із секреторною/екскреторною (ендо-/екзо-) активністю та без неї. До першої групи входили всі органи, які секретують гормони (наднирники та щитовидна залоза, яєчник, яєчка, підшлункова залоза, тимус) або залежні від них (молочна залоза, матка, маткові труби, простата та придатки яєчка) та бар'єрні органи (шлунок, кишечник, печінка, нирки, лімфатичні вузли,

сечовий міхур і легені). Отже, мозок, мозочок, селезінка, серце, жир та напружені м'язи були включені до другої групи (без цієї активності). Всі SEACAM1-позитивні органи об'єднує той факт, що в них судини відіграють значну роль у контролі проникнення різних речовин у кров'яно-лімфатичний потік: гормони в ендокринних та ендокринно-залежних органах, продукти обміну в шлунково-кишковому тракті, печінці, нирках та бар'єрні органи (сечовий міхур, легені тощо). На наш погляд, це може бути пов'язано з участю SEACAM1 у контролі проникності судин, що було доведено в інших дослідженнях. З іншого боку, наші висновки демонструють виключно експресію SEACAM1 в капілярах, венозних та лімфатичних судинах. Там присутній рух речовин крізь стінки судин, порівняно з артеріями, де цей процес відсутній. Свідченням цього є також їх переважання в лімфатичних судинах, основною функцією яких є всмоктування речовин з тканин. Ці результати дозволяють припустити гіпотезу про бар'єрну функцію SEACAM1 в тонкостінних судинах, що беруть участь у регуляції існування різних органів.

У статтях регулярно приділяється увага виключно експресії SEACAM1 у зростаючих судинах новоутворених тканин та їх присутності у всіх незрілих дрібних судинах. З одного боку, ми відкинули цю ідею шляхом дослідження нормальної тканини, де також були присутні позитивні судини SEACAM1. З іншого боку, було проведено дослідження різних видів тканин (новоутвореної тканини передміхурової залози, шкіри з грануляційною тканиною та ембріональної тканини) з постійним зростанням судин. Ми вказали ті самі дані, порівняні з нормальною тканиною - лише частина тонкостінних судин експресує рецептори SEACAM1, хоча більшість з них формуються синхронно з тканинами, що ростуть у цих органах. Це дозволяє стверджувати про наявність SEACAM1 у різних тканинах (нормальних, пухлинних, ембріональних) та про його незалежність від процесу їх росту (ангіогенез). Наші розбіжності з іншими опублікованими даними ми

пов'язуємо з використанням нових моноклональних мишачих антитіл C5-1X8 та їх вищою чутливістю до рецепторів SEACAM1.

VEGF є одним з найважливіших проангіогенних факторів, які стимулюють проліферацію, хемотаксис та утворення мікросудинних ендотеліальних клітин. Неодноразово вказувалося на їх взаємозв'язок з SEACAM1 в ендотеліоцитах та їх взаємомодуючі ефекти. Наші результати частково підтверджують це дані, вказуючи на присутність SEACAM1 у переважній більшості позитивних судин SEACAM1. Тоді як відсутність рецепторів SEACAM1 в деякій частині VEGF-позитивних судин (усіх VEGF-позитивних артеріях та невеликій частині VEGF-позитивних вен) свідчить про їх частково різноспрямовані функції, які незалежно реалізуються в організмі людини.

Звичайно, під час нашого дослідження ми виявили експресію SEACAM1 в інших патернах (епітелій, імунні клітини тощо) досліджуваних тканин (ембріональна, нормальна та злоякісна).

Підсумовуючи всі отримані результати, можна зробити висновок, що експресія SEACAM1 присутня виключно в тонкостінних судинах (капіляри, венозні та переважна частина лімфатичних судин), а артерії є SEACAM1-негативними (незалежно від статі та віку). Ці білки доступні в судинах більшості нормальних органів людини, хоча нервові, м'язові та жирові тканини є SEACAM1-негативними. Перебуваючи в ендотеліальних клітинах, вони відіграють значну роль у бар'єрній функції стінки судини.

Тканини з постійним ангіогенезом (ембріональна, грануляційна, пухлинна) супроводжуються експресією SEACAM1 в ендотеліальних клітинах, але їх наявність має частковий характер - SEACAM1-позитивні, а також SEACAM1-негативні судини, розташовані там.

VEGF впливає на експресію SEACAM1, що було доведено переважною присутністю SEACAM1-позитивних судин одночасно з експресією VEGF в них. Наявність рецепторів SEACAM1 в деяких VEGF-негативних судинах і навпаки вказує на їх часткові різноспрямовані функції.

6 ВИКОРИСТАННЯ ФЛЮОРОФОР-КОН'ЮГОВАНИХ АНТИТІЛ ДО СЕАСАМ ПРИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН ТА ЇХ МЕТАСТАЗІВ

Злоякісні пухлини є провідною причиною смерті в усьому світі. При цьому колоректальний рак – третій за поширеністю рак і четверта причина смертності, пов'язаної з раком, як правило, внаслідок метастазів у печінку. Хірургічна резекція є звичайною частиною плану лікування пацієнтів з колоректальним раком. В останні роки відбувся перехід хірургічного лікування раку прямої кишки до більш малоінвазивних методів, таких як лапароскопічні та роботизовані платформи, що призводить до втрати тактильного зворотного зв'язку з хірургами.

Незважаючи на ефективність хірургічних методів лікування, попередні дослідження повідомляють про 5,3%-у позитивність радіальних країв, що визначається як залишкове захворювання на межі хірургічної резекції. Хірургія під контролем флуоресценції (ХпКФ) може поліпшити виявлення меж пухлини та залишкових позитивних захворювань після резекції. Попередні дослідження на ортотопічних моделях мишей з раком товстої кишки продемонстрували, що ХпКФ може покращити виявлення країв пухлини і призвести до збільшення частоти успішної резекції. Ще однією причиною прогресування раку товстої кишки є невиявлені окультні метастази.

Існують дані про використання карциноембріональних антигенів у якості ідеальних мішеней для візуалізації пухлинних клітин *in vivo*. Нещодавно було показано, що *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) специфічно зв'язується через білок зовнішньої мембрани НорQ з людськими СЕАСАМ1, 3, 5 і 6 з високою спорідненістю. Взаємодія НорQ-СЕАСАМ не залежить від кальцію, а також від рН та є необхідною для транслокації онкогенного токсину СаgА в клітини-господарі людини. У цьому дослідженні ми використовували флуоресцентно мічений рекомбінантний бактеріальний

білок НорQ, щоб перевірити його придатність для націлювання на флуоресценцію колоректальних пухлин у моделях PDOX та ортотопічного раку товстої кишки.

Матеріали та методи

Антитіла та реагенти

Медіа та додатки до них були придбані у Gibco-Life Technology (Еггенштейн, Німеччина), а хімічні речовини - у Sigma (Тауфкірхен, Німеччина), якщо не зазначено інше. Гібридома, що секретує мишачий mAb 6G5j (специфічний для людини CEACAM1/3/5/6/8), нещодавно була описана. Контролі анти His mAb 2B6 та ізотипу IgG були придбані у LeukoCom (Німеччина) та mAb 9E10, специфічного для міток с-тус, від AbD Serotec (Німеччина). Ізотіоціанат флуоресцеїну (FITC) та мічені пероксидазою хрому (HRP) вторинні козячі анти-мишачі фрагменти IgG F (ab)2 та стрептавідин-Су-3 були отримані від Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). Зчеплення rНорQ з фікоеритрином (PE) проводили за допомогою набору для швидкого маркування PE (Expedeon/Abcam, Берлін, Німеччина) відповідно до протоколу виробника.

Рекомбінантне виробництво НорQ

Фрагмент гена НорQ, що кодує від 22 до 447 амінокислот, ампліфікували за допомогою геномної ДНК, приготовленої із штаму *H. pylori* P12 (Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit, Hilden, Німеччина), Таq-полімерази (Invitrogen, США) та олігонуклеотидів, які включали сайт рестрикції NcoI та BamHI. Продукт ПЛР, очищений у колонці, розщеплювали NcoI та BamHI, очищали гелем та клонували у відповідну розщеплену плазмиду pOPE101. Експресійна касета складається з лідера *pelB*, усіченої послідовності НорQ22-447, за якою слідує с-тус- та (His)6-мітка для виявлення та очищення відповідно.

Плазмиду трансформували в *E. coli* XL10 Gold (Стратаген, США) і відбирали трансформанти на агарових планшетах LB, що містять 100 мкг/мл карбеніциліну, 12,5 мкг/мл тетрацикліну та 0,1 М глюкози як репресора. Для

експресії культуру протягом ночі в селективному середовищі LB (100 мкг/мл карбеніциліну, 12,5 мкг/мл тетрацикліну та 0,1 М глюкози розбавляли у свіжоприготовленому аналогічному селективному середовищі та вирощували при 37 °С до досягнення оптичної щільності (при 600 нм) 0,6, після чого експресія білка була індукована додаванням IPTG до кінцевої концентрації 75 мкМ. Через 12 годин індукції при 24°С (230 об/хв) білки збирали з периплазматичного простору. Коротко кажучи, гранульовані бактерії ресуспендували в 1/10 об'єму культури холодного розчину сферобласту (50 мМ трис-НСІ рН = 8,0, 20% сахарози, 1 мМ ЕДТА) і обережно струшували протягом 1 години при 4 °С. Суспензію центрифугували при 30000 об. протягом 1 години при 4 °С, а супернатант, що представляє собою периплазматичний екстракт, двічі протягом ночі діалізували у 5 л PBS при 4 °С. Розчин пропускали через фільтр 0,44 мкм і регулювали до 0,5 М NaCl і 20 мМ імідазолу для завантаження на колонку Ni-NTA FPLC (GE-Healthca re, США). 6-мічений білок (His) елюювали буфером для елюції (PBS доводили до 0,5 М NaCl та 0,5 М імідазолу), і білковмісні фракції двічі діалізували протягом ночі у 2 л PBS при 4 °С. Аліквоти гНорQ доводили до 1 мг/мл за допомогою PBS і зберігали при - 20°С. Чистоту та цілісність білка підтвердили фарбуванням Coomassie-gel та імуноблотом з використанням специфічного mAb 9E10 мітки с-тус. Очікувана молекулярна маса обробленого гНорQ становить 47,814 Da, включаючи мітки.

Культура клітин

Епітеліальні клітинні лінії LS174T (карцинома товстої кишки людини), шлунка (MKN45), товстої кишки (HT29, Сасо-2) та альвеолярні (A549) ракові клітинні лінії, які всі ендогенно експресують CEACAM1, CEACAM5 і CEACAM6, культивували в DMEM (GIBCO) з додаванням 10% теплової інактивованої фетальної телячої сироватки (FCS) та 4 мМ L-глутаміну при 37 °С у зволоженому стані – 5% CO₂ (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Для експериментів клітини використовували в герметичному конфлюентному стані завдяки найкращій експресії CEACAM. Зазначені

трансфектанти CHO культивували в DMEM (GIBCO), доповненому 1 мг/мл G418, 10% інактивованим FCS і 4 мМ L-глутаміну. У всіх випадках перед використанням тестували життєздатність клітин і виявили, що вона перевищує 90%.

Кон'югація флюорофору

Ефір NH8 IR800DyeCW (IR800) (LI-COR Biosciences Inc., Лінкольн, Небраска) кон'югували з білком rHspQ (rHspQ-IR800) згідно з протоколом виробника. rHspQ-IR800 інкубували на ротаційній пластині (Fisher Scientific, Hampton, NH) в основних умовах при кімнатній температурі протягом 2 годин. Колонки для знесолення гелів (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) використовували для видалення незв'язаного барвника шляхом додавання суміші та тричі центрифугували при 1500 об/хв протягом 3 хвилин. Після центрифугування rHspQ-IR800 видаляли з колонки і зберігали при 4 °C до подальшого використання.

Прямий імуоферментний аналіз (ІФА)

Прямий ІФА проводили із зазначеними клітинними лізатами, розподіленими по 100 мкл на лунку в 96-лункових мікропланшетах (Nunc MaxiSorp, Nalge Nunc) у трьох примірниках. Після блокування 360 мкл 1 % BSA/PBS лунки інкубували з 100 мкл 5 мкг/мл rHspQ, розведеного в 1 % BSA/PBS, промивали 3 рази PBS і мітили 100 мкл anti His mAb 2B6 (5 мкг/мл). В якості контрольного забарвлення зразки інкубували з mAb 6G5j або відповідним ізотипу контролем (5 мкг/мл). Потім планшети промивали три рази PBS і інкубували з HRP-зв'язаним козячим антитілом проти миші (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc.). Після промивання забарвлення продовжували з 100 мкл/лунка розчином тетраметилбензидину (TMB Xtra, EcoTrak). Ферментативну реакцію зупиняли 200 мМ розчином H₂SO₄ і вимірювали абсорбцію при 450 нм у зчитувачі мікропланшетів (Sunrise, Tecan).

Проточна цитометрія

Зазначені типи клітин маркували rHspQ-PE (1:25) та mAb 6G5j (10 мкг/мл), розведених у 3% FCS/DMEM протягом 1 год, промивали 3% FCS/DMEM, а у випадку mAb інкубували з кон'югованими FITC козячими антитілами до миші F (ab') 2 (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc.) розведене 1:50 у 3% FCS/DMEM. Фонову флуоресценцію визначали за допомогою ізотипу, відповідного Ig. Забарвлені зразки клітин досліджували на проточному цитометрі FACScalibur (Becton Dickinson), а дані аналізували за допомогою програмного забезпечення CellQuest (Becton Dickinson). Зразки з ідентифікованими загиблими клітинами, виявлені за допомогою забарвлення ПІ (5 мкг/мл), були виключені з дослідження.

Імуногістохімія та імунофлуоресценція

Серійні зрізи 4 мкм завтовшки готували з парафінових блоків тканин простати та шлунка людини, попередньо фіксованих у нейтральному забуференому формаліні та поміщали на предметні стельця, покриті 3-амінопропілтриетоксисиланом, демаскували (10 хв при 95 °C у цитратному буфері, рН 6). Ендогенну пероксидазну активність блокували обробкою 3% H₂O₂ протягом 5 хвилин і подальшим промиванням PBS. Потім зрізи блокували 1% BSA/PBS і забарвлювали 10 мкг/мл rHspQ-біотину з подальшим або HRP- (IHC), або Cy-3- (IF), зв'язаним стрептавідином (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc.). Забарвлені зрізи були змонтовані та задокументовані мікроскопією. Флуоресцентне забарвлення аналізували за допомогою мікроскопа Leica DMI4000B.

Вестерн блотинг

Зазначені клітинні лінії лізували в буфері для лізису на основі RIPA, що містить 50 mM Tris-HCl, рН 7,5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% дезоксихолату натрію, доповнений коктейлем ПІ інгібітора протеази (Calbiochem) та інгібітором фосфатази PhosSTOP коктейль (Roш) на льоду протягом 30 хв. Лізати центрифугували при 10000 об. та 4 °C протягом 15 хв, і приблизно 50 мкг загального білка піддавали SDS-PAGE, блотували до

нітроцелюлозної мембрани (Schleicher & Schuell, Dassel, Німеччина) і реагували з mAb 6G5j (позитивний контроль), контроль ізотипу mAb та rHspQ, за яким слідує анти His mAb 2B6, відповідно. Після промивання зв'язаними з HRP козячими антимишиними pAb або стрептавідіном і згодом виявляли за допомогою хелілюмінесцентного субстрату ECL і контролювали за допомогою системи документації гелю LAS3000 (Fuji). В якості контролю навантаження виконували і візуалізували фарбування Понсо Червоним (Пірс).

Для перевірки розміру та чистоти 2,5 мкг, 5 мкг та 7,5 мкг rHspQ, розведених у буфері Леммлі, розчиняли на 9% трициновому гелі. Згодом гель фарбували за допомогою Fast Gene Q-Stain (Nippon Genetics) згідно з протоколом виробника та документували за допомогою системи візуалізації Chemidoc (Bio-Rad).

Тварини

Самки та самці миші віком 4-6 тижнів були придбані в лабораторії Джексона (Бар-Харбор, штат Мексика). Мишей розміщували у приміщенні з біобезпеки та годували лабораторно затвердженою автоклавною їжею. Для хірургічних процедур мишей знеболювали внутрішньоочеревинною ін'єкцією ксилазину, кетаміну та PBS. Біль після процедурного болю лікували підшкірним бупренорфіном. На завершення експериментів мишей евтаназували вдиханням CO₂ з подальшим вивихом шиї. Дослідження були схвалені Інституційним комітетом з догляду та використання тварин медичного центру адміністрації ветеранів Сан-Дієго (IACUC, протокол використання тварин A17-020). У стерильних умовах клітини LS174T (1x10⁶), відновлені в 50 μ L Matrigel Matrix (Corning Life Sciences, Corning, NY) і 50 μ L холодного PBS вводили в черевну порожнину. Пухлини зростали приблизно до 5 мм у діаметрі. Згодом пухлини резекували і розділяли на фрагменти розміром 1 мм.

Пухлини від пацієнтів були обрані на основі раніше опублікованих даних, що демонструють надмірну експресію CEACAM у лізатах пухлини C4

та легені 4 (C4 = хірургічно резектований первинний рак товстої кишки та легені 4 = хірургічно резектований метастаз раку товстої кишки). Клітинні лінії легенів 4 та C4 представляють пухлини товстої кишки, отримані за інформованою згодою пацієнта. Після хірургічної резекції пухлини транспортували у формаліні. Після внутрішньочеревної анестезії спини миші стерилізували 70% розчином етанолу і робили невеликий розріз над середньою лінією спини через шкіру. Фрагменти пухлини імплантували на підшкірні двосторонні боки і плечі оголених мишей. Пухлини зростали приблизно протягом 4 тижнів.

Для ортотопічної імплантації голим мишам (n = 11) вводили коктейль для внутрішньочеревної анестезії. Живіт стерилізували 70% розчином етанолу. Невеликий розріз був зроблений на середній лінії через шкіру та очеревину. Сліпа кишка була ретельно ідентифікована. 2-міліметровий фрагмент пухлини товстої кишки (C4 або легені 4) або пухлини лінії клітин лінії раку товстої кишки LS174T, раніше вирощеної на підшкірних моделях оголених мишей, імплантували на серозу сліпої кишки за допомогою нейлонового шва 8-0 (Ethicon Inc, Соммервіл, Нью-Джерсі). Очеревину та шкіру закривали 6-0 нейлоновим швом (Ethicon Inc, Sommerville, NJ). Пухлини зростали приблизно до 5 мм у діаметрі.

Фіксація флуоресцентного сигналу

Як тільки ріст пухлини був достатнім, як визначено, мишам PDOX (n = 5) вводили різні дози (25 мкг або 50 мкг відповідно) rНорQ-IR800, відновленого в PBS, шляхом ін'єкції в хвостову вену. Мишей знімали через 24 або 48 годин після введення. Перед візуалізацією мишам вводили внутрішньочеревну анестезію, а сліпу кишку піддавали хірургічному впливу. Візуалізацію проводили на системі візуалізації дрібних тварин LI-COR Pearl Trilogy (LI-COR, Лінкольн, Небраска), яка обладнана для флуоресцентного зображення на 700 і 800 нм. Ортотопічні моделі клітинних ліній (n = 6) були зроблені через 48 годин після введення 50 мкг rНорQ-IR800, відновленого в PBS за допомогою ін'єкції хвостової вени, як детально описано вище.

Статистичний аналіз

Відношення пухлини до фону (TBR) розраховували як максимальний сигнал флуоресценції пухлини, поділений на максимальний фоновий флуоресцентний сигнал. Фон був встановлений на оточуючих внутрішньочеревинно органах (переважно тонка кишка). Сигнали флуоресценції кількісно визначали за допомогою автоматизованих областей, що генеруються за допомогою програмного забезпечення Image Studio, із стабільним стандартним відхиленням від фонового сигналу 10 і мінімум 250 пікселів на область. Середній TBR був розрахований для мишей через 48 годин після введення 50 мкг rHspQ-IR800 за допомогою SPSS версії 24 (IBM, Armonk, NY).

Результати дослідження

Проточні цитометричні аналізи з використанням трансфектантів, що експресують людські CEACAM1, 3, 5, 6 і 8, продемонстрували зв'язування rHspQ-PE з CEACAM 1, 3 і 5 (рис. 6.1-А).

Ізотип, що відповідає IgG та 6G5j, як CEACAM-зв'язуюче моноклональне антитіло (mAb) використовували як позитивний контроль. Зв'язування rHspQ з людським CEACAM1, 3 і 5 було підтверджено методом ІФА. Зазначені трансформовані лізати CHO були іммобілізовані та виявлені за допомогою rHspQ з подальшим виявленням проти His mAb 2B6 або фарбуванням mAb 6G5j як позитивний контроль (рис. 6.1-Б). Вестерн-блоттінг продемонстрував, що rHspQ виявляв ендогенно експресовану CEACAM1 та CEACAM5 у лізатах епітеліальних клітинних ліній, отриманих із шлункових (MKN45), товстокишкових (HT29, Caco-2) та альвеолярних (A549) ракових клітинних ліній (рис. 6.2). Крім того, rHspQ справді зв'язувався з лізатами CHO-CEACAM1 та 5 (рис. 6.2-А).

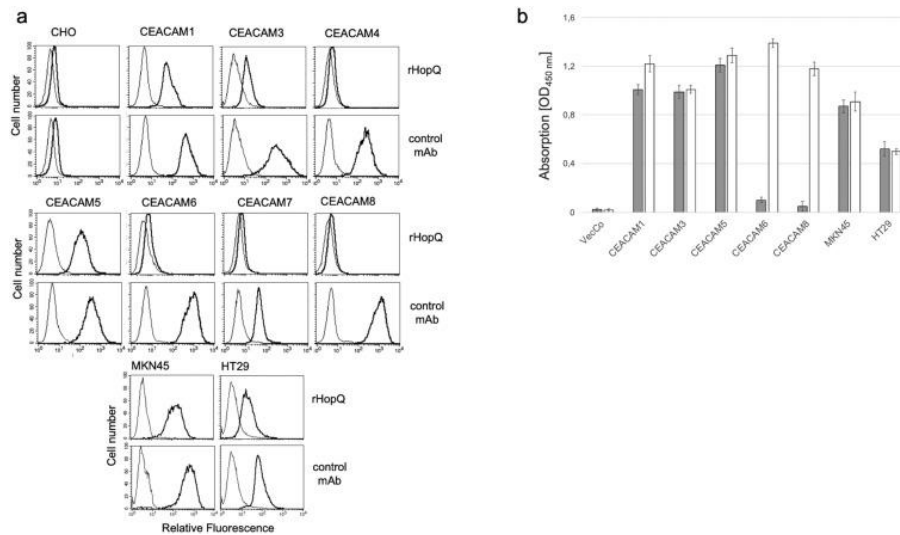


Рисунок 6.1 – Реконбінантні властивості зв'язування НорQ. А – Проточний цитометричний аналіз зв'язування rНорQ-PE із трансфектантами CHO, що експресують зазначені CEACAM людини та клітинні лінії, що ендогенно експресують CEACAM. rНорQ та забарвлення mAb позитивного контролю показано чорною лінією, забарвлення негативного контролю – сірою лінією.

Б – Аналізовані ІФА лізати були іммобілізовані та зв'язані з rНорQ з подальшим мишачим анти-His mAb 2B6 (LeukoCom, Німеччина, сірі смуги) або забарвленням mAb позитивного контролю (білі смуги), з подальшою інкубацією з HRP-зв'язаним вторинним антитілом та субстратом ТМВ для фарбування. Дані є репрезентативними для трьох незалежних експериментів

Далі ми проаналізували ефективність rНорQ-PE в імунному гістологічному забарвленні з використанням 4% клітин PFA HT29 (Рис. 2Б) та зрізах тканин тонкої кишки людини (рис. 6.2–В).

Інтравітальна візуалізація реакції на дозу на моделях раку товстої кишки PDOX (n = 4) легені 4 після введення 25 мкг rНорQ-IR800 продемонструвала низький рівень TBR через 24 та 48 годин після введення (TBR = 0,901 та 1,220 відповідно) (рис. 6.3–А,Б). Після введення 50 мкг rНорQ-IR800, PDOX-моделі легенів 4, отримані через 24 години, мали TBR = 1,778 (рис. 6.3–В). Через 48 годин після введення 50 мкг rНорQ-IR800,

візуалізація продемонструвала $TBR = 3,576$, найвищий рівень TBR (рис. 6.3 – Г).

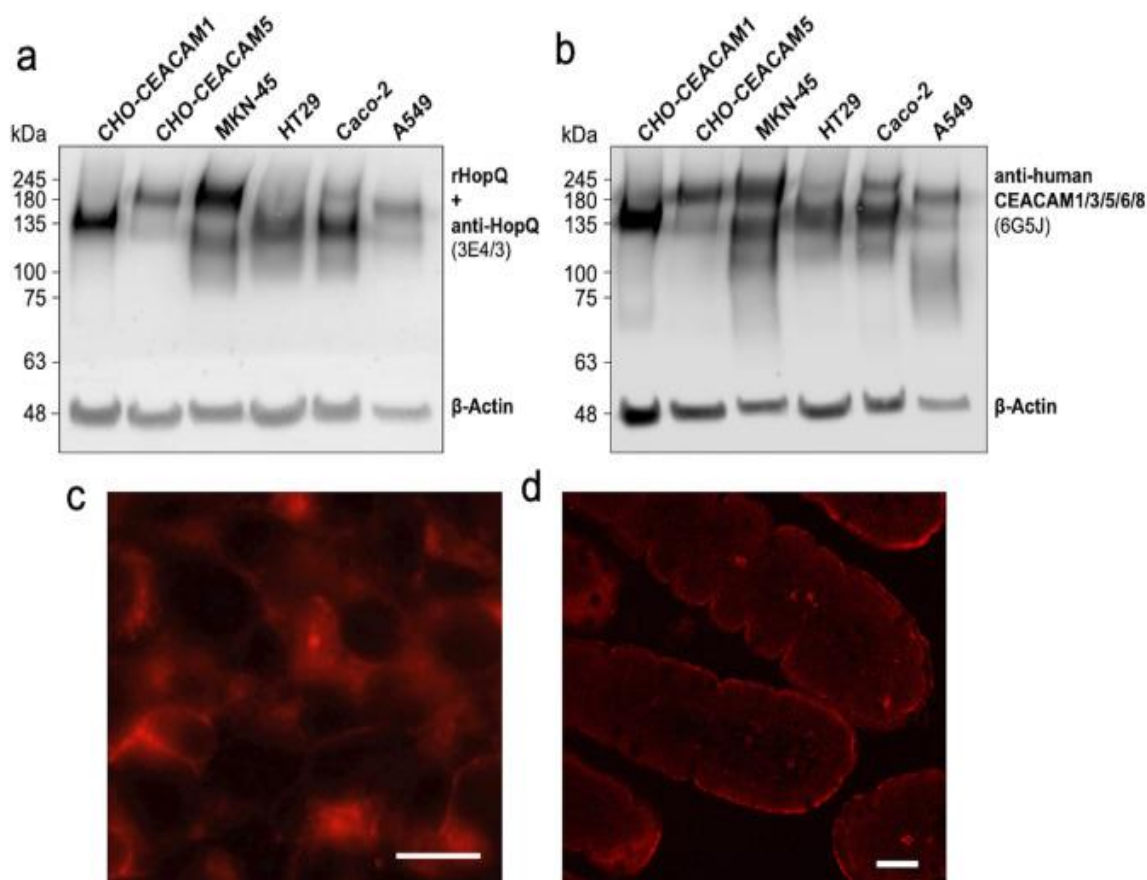


Рисунок 6.2 – Вестерн-блот, флуоресцентне забарвлення та імуногістохімія зв'язування рекомбінантного НорQ з CEACAM1, CEACAM5 та ендогенно експресованими CEACAMs. А – Вестерн-блот-аналіз зв'язування rНорQ (А) та mAb 6G5j (Б) з лізатами, що походять від CHO-CEACAM1, CHO-CEACAM5, раку шлунка (MKN45), товстої кишки (HT29, Caco-2) та альвеолярного (A549) раку, виявлені хемілюмінесценцією. Бета-актинове фарбування використовували для контролю належного завантаження зразків.

Наведені репрезентативні дані двох окремих експериментів. В – Флуоресцентне фарбування вбудованих у парафін клітин HT29, мічених 10 мкг/мл НорQ-PE. Г – Імуногістохімія вкладеної в парафін тканини тонкої кишки людини, міченої 10 мкг/мл біотинільованого НорQ, з подальшим використанням стрептовідину, пов'язаного з Су3. Шкали представляють

100 мкм

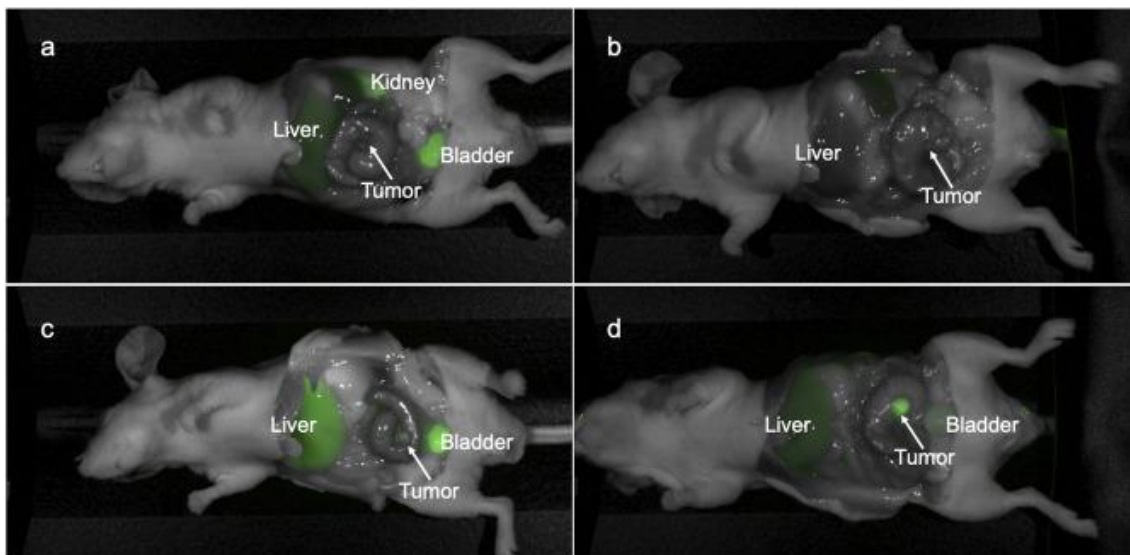


Рисунок 6.3 – Флуоресцентна візуалізація реакції на дозу на моделі легень 4 PDOX демонструє чіткі границі пухлини діаметром <math>< 2\text{ мм}</math>. А – Зображення через 24 години після введення 25 мкг rHspQ-IR800, TBR = 0,901. Б – Зображення через 48 годин після введення 25 мкг rHspQ-IR800, TBR = 1.220. В – Зображення через 24 години після введення 50 мкг rHspQ-IR800, TBR = 1,778. Г – Зображення через 48 годин після введення 50 мкг rHspQ-IR800, TBR = 3,576

Невеликі пухлини діаметром менше 2 мм, в іншому випадку невидимі, були легко зображені з мінімальним фоновим сигналом (Рис. 3В). Флуоресценція печінки з'явилася внаслідок метаболізму IRdye800. Візуалізацію підтвердили за допомогою іншої моделі раку товстої кишки PDOX (C4) з TBR = 3,977 через 48 годин після введення 50 мкг rHspQ-IR800 (рис. 6.4).

Моделі клітинних ліній ортотопічного раку товстої кишки ($n = 6$) були зображені через 48 годин після введення 50 мкг rHspQ-IR800. Межі пухлини чітко ідентифікували із середнім значенням TBR = 3,678 (SD \pm 1,027). Одна модель клітинної лінії мала регіональні метастази діаметром приблизно 2 мм, які також чітко розглядались за допомогою флуоресцентних зображень (рис. 6.5).

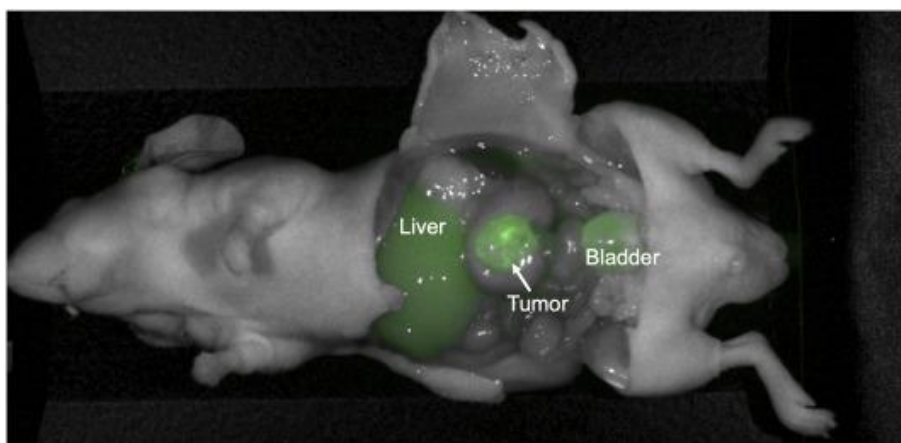


Рисунок 6.4 – Флуоресцентне зображення моделі C4 PDOX через 48 годин після введення 50 мкг rHspQ-IR800, TBR = 3.977

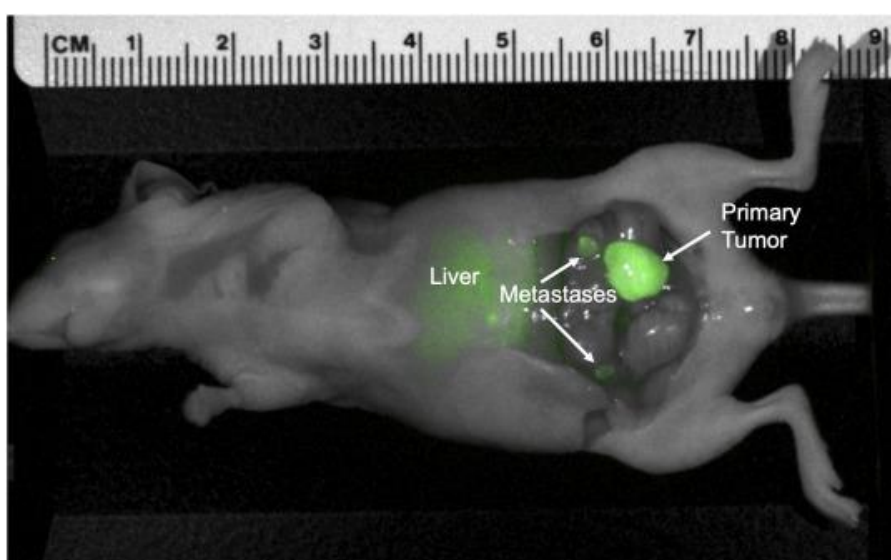


Рисунок 6.5 – Репрезентативне зображення моделі ортотопічної клітинної лінії раку товстої кишки (LS174T) через 48 годин після введення 50 мкг rHspQ-IR800. Первинна пухлина та регіональні межі метастазів чітко розглядаються. Середнє значення TBR = 3,678 (SD ± 1,027), n = 6

Обговорення

Вперше ми показуємо, що білок бактеріальної адгезії потенційно може бути використаний для виявлення метастатичного колоректального раку на клінічно значущій моделі миші PDOX. Рекombінантний HspQ-IR800 специфічно зв'язується з CEACAM1 і 5 для візуалізації флуоресцентної інфрачервоної індикації ортотопічних клітинних ліній та моделей PDOX-

мишей раку товстої кишки. Результати цього дослідження узгоджуються з попередніми висновками, що CEACAM є ідеальними мішенями для флюоресцентної візуалізації *in vivo* раку товстої кишки, як продемонстровано на моделях мишей PDOX з кон'югатом анти-CEACAM антитіло-флуорофор. Важливо зазначити, що гНорQ зв'язується з CEACAM1, навіть у поєднанні з різноманітними флюорохромами або біотином. Отже, гНорQ може бути використаний для широкого спектру застосувань, включаючи проточну цитометрію, ІФА, вестерн-блот і імуногістохімічні підходи. Через 48 годин спостерігається найкраще співвідношення пухлина/фон. На відміну від глікозилізованих антитіл, гНорQ є бактеріальним білком без глікозилювання, що захищає його від деградації. Хоча в попередній літературі було продемонстровано, що гНорQ зв'язує CEACAM1, 3, 5 і 6, нами не виявлено їх взаємодії з CEACAM6. Це може пояснюватись тим, що НорQ має вищу спорідненість до CEACAM1, 3 і 5, тоді як взаємодія з CEACAM6 має низьку спорідненість. Потрібні подальші аналізи для з'ясування цієї гіпотези.

Продемонстровано, що CEACAM є корисною мішенню для хірургічного втручання, керованого флуоресценцією. Хоча було продемонстровано, що антитіло до CEACAM 6G5j-IR800 має TBR 3,17, у цьому дослідженні ми виявили, що гНор-IR800 має середній TBR 3,678. У порівнянні з раніше опублікованими даними про антитіло проти CEACAM 6G5j, яке має молекулярну масу 150 кДа, гНорQ має молекулярну масу 47 кДа, що може дозволити гНорQ ефективніше доставлятися до цілі, ніж більші антитіла. Подальші дослідження будуть проведені для безпосереднього порівняння властивостей 6G5J-IR800 та гНорQ-IR800 в ортотопічних моделях мишей раку товстої кишки.

Раніше було показано, що ХпКФ є ефективною для досягнення повної резекції пухлини та зменшення частоти рецидивів пухлини на ортотопічних моделях мишей. Це дослідження демонструє, що гНорQ-IR800 зміг виявити невеликі первинні пухлини та метастази, що є перспективним для ефективною ХпКФ. Для підтвердження цієї гіпотези необхідні подальші дослідження. На

додаток до первинного раку товстої кишки, флуоресцентна візуалізація може бути корисною для візуалізації колоректальних метастазів. Невеликі метастази в печінку часто важко ідентифікувати на передопераційній візуалізації або при інтраопераційній візуалізації та можуть суттєво погіршити прогноз. Попереднє дослідження продемонструвало, що флуоресцентна візуалізація може покращити виявлення та резекцію метастазів у печінку, що походять від раку товстої кишки. Це дослідження показує, що rNopQ-IR800 ефективний для візуалізації прихованих метастазів колоректального раку.

У цьому дослідженні ортотопічні пухлинні клітини раку товстої кишки та дві моделі PDOX раку товстої кишки, одна з первинних пухлин пацієнтів, а інша з метастатичної пухлини, були флуоресцентно візуалізовані за допомогою rNopQ-IR800, що є перспективним для успішного переходу в гетерогенні клінічні умови. У цьому дослідженні підкреслюється важливість ортотопічних моделей мишей для надання клінічно значущих моделей раку.

Обмеження цього дослідження включають невеликий обсяг вибірки моделей мишей. Подальші дослідження будуть проведені з додатковими моделями метастазів у печінку для підтвердження ефективності rNopQ-IR800 при виявленні метастазів у печінку на моделі миші PDOX. Нова книга "Стратегії лікувальної хірургії, керованої флуоресценцією", під редакцією Гофмана та Буве, визначає численні флуоресцентні зонди, які використовуються для визначення меж пухлини на різних моделях раку, а також у клініці. На сьогоднішній день існує вісім флуоресцентних зондів антитіл у клінічній розробці для різних типів раку та один флуоресцентний зонд на основі білка в клінічному дослідженні. Перед використанням у клінічних умовах rNopQ-IR800 вимагає тестування на безпеку та ефективність у хворих на рак людини. Іншим обмеженням цього дослідження є те, що rNopQ націлений на пухлини людини, а не на тканини миші, що може призвести до штучно підвищеного TBR. Крім того, здатність rNopQ зв'язуватися з безліччю SEACAM може призвести до зв'язування нормальної

тканини на додаток до пухлини, що може призвести до зниження TBR. Потрібні подальші дослідження для оцінки ефективності гНорQ для візуалізації первинного та метастатичного раку товстої кишки людини.

Це дослідження демонструє високу спорідненість гНорQ до епітеліальних злоякісних пухлин, які надмірно експресують CEACAM, включаючи рак товстої кишки, шлунка та легенів. Рекombінантна флуоресцентна візуалізація, що ґрунтується на НорQ-рецепції, забезпечує чітку візуалізацію первинних пухлин та метастазів у PDOX та ортотопічних моделях клітинної лінії миші раку товстої кишки. гНорQ може бути корисною альтернативою специфічним до CEACAM антитілам для дохірургічної діагностики, інтраопераційної візуалізації та флуоресцентної хірургії при злоякісних пухлинах, які надмірно експресують різні CEACAM. Потенційні переваги гНорQ перед зондами на основі антитіл включають нижчу молекулярну масу, що може призвести до поліпшення доставки флуоресцентного зонда. Подальші дослідження визначать клінічний потенціал гНорQ.

7 ДОСЛІДЖЕННЯ УЧАСТІ СЕАСАМ ЛЮДИНИ З БАКТЕРІАЛЬНИМИ БІЛКОВИМИ ДОМЕНАМИ

СЕАСАМ є сімейством з 12 рецепторів на поверхні клітин, що належать до надсімейства імуноглобулінів (Ig) (IgSF). Деякі з СЕАСАМ експресуються на епітеліальних клітинах, ендотеліальних клітинах і лейкоцитах, тоді як інші СЕАСАМ мають більш обмежений профіль експресії. СЕАСАМ регулюють імунні реакції шляхом утворення гомофільних та гетерофільних взаємодій. Ці властивості дозволяють СЕАСАМ регулювати численні фізіологічні та патофізіологічні процеси, включаючи міжклітинні зв'язки, диференціювання епітелію, апоптоз та регуляцію прозапальних реакцій. Усі СЕАСАМ, крім СЕАСАМ16, прикріплюються до клітинної поверхні за допомогою будь-якого трансмембранного домену або якіря глікофосфатидилінозиту (GPI). Кожен СЕАСАМ складається з N-кінцевого домену зі структурою V-набору (IgV) та різною кількістю складок C2-набору (IgC2). Гомофільні та гетерофільні взаємодії опосередковуються димеризацією N-кінцевих складок IgV. Ряд бактеріальних збудників взаємодіють з людськими рецепторами СЕАСАМ. Ці патогени переважно специфічні для людини і включають *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* та *Fusobacter spp.* На сьогоднішній день всі досліджені патогени пов'язують СЕАСАМ1 і додатково зв'язуються з СЕАСАМ5 та/або СЕАСАМ6. Усі бактерії, які взаємодіють із СЕАСАМ людини є грамнегативними мікроорганізмами. Кожна з цих бактерій експресує специфічний адгезин на клітинній поверхні, який зв'язується з людським СЕАСАМ. Цю властивість, очевидно, було надбано в процесі конвергентної еволюції. Взаємодія з СЕАСАМ надає можливість бактеріям посилити адгезію та інвазію до епітеліальних покривів людини завдяки високоспецифічним білково-білковим взаємодіям. Однак імунна система еволюціонувала для протидії експлуатації збудників СЕАСАМ через

СЕАСАМ3, фагоцитарний рецептор, який експресується виключно на нейтрофілах та може виявляти та елімінувати деякі СЕАСАМ-зв'язуючі патогени. Слід зазначити, що всі бактеріальні ліганди з високою спорідненістю зв'язуються з інтерфейсом димеризації СЕАСАМ N-кінця IgV домену. Однак деталі структурних взаємодій рецепторів адгезин-СЕАСАМ були вирішені лише для HopQ *H. pylori* та AfaE *E. coli*.

В рамках даного дослідження ми перевірили ряд людських грампозитивних бактеріальних збудників на їх здатність взаємодіяти з СЕАСАМ1 людини. Ми виявили, що штами *Streptococcus agalactiae* (також відомі як *Streptococcus* групи В; GBS) взаємодіють з рецепторами СЕАСАМ, що є першою демонстрацією того, що СЕАСАМ можуть бути ціллю для грампозитивних патогенів. Стрептококи GBS є основною причиною розвитку небезпечних для життя бактеріальних інфекцій у неонатальному періоді, як передачі збудника від матері до немовляти. Ми виявили, що поверхневий білок GBS містить домен IgSF, який специфічно зв'язується з СЕАСАМ1 та СЕАСАМ5 людини. Ця взаємодія посилила адгезію експресуючого GBS до СЕАСАМ-позитивних епітеліальних клітин. Ми застосували структурні методи, щоб продемонструвати, що цей IgSF-домен має унікальні структурні особливості і являє собою невідомий раніше варіант складки IgI, який ми називаємо складкою І3-набору (IgI3). Унікальні особливості включають відсутність залишків цистеїну, відсутність ланцюгів С' і С'' у топології та усічену послідовність С, за якою безпосередньо слідує 1,5-оборотна 1.5-спіраль. Саме ці особливості домену-IgI3 дозволяють націлювати інтерфейс димеризації N-домену СЕАСАМ1. Гомологи -IgI3 були виявлені у кількох бактеріях людини, включаючи патогени, і, як передбачалося, вони мають структурні особливості IgI3. Ми демонструємо, що один із цих варіантів IgI3 також зв'язується з СЕАСАМ1, незважаючи на значні зміни залишків в межах зв'язуючого інтерфейсу СЕАСАМ, вказуючи на те, що взаємодія між бактеріальними доменами IgI3 та СЕАСАМ може мати велике значення.

Матеріали та методи дослідження

Умови вирощування бактерій

Бактерії культивували в бульйоні Тодда-Хьюїтта (TH; *S. agalactiae*), бульйоні TH + 1% дріжджів (*S. pyogenes*), триптичному соєвому бульйоні (TSB; *S. aureus*) або відварі лізогену (LB; *E. coli*), доповнені антибіотиками.

Експресія та очищення глікозильованих та неглікозильованих rSEACAMs

Глікозильовані SEACAM експресували та очищали з клітин Expi29F (Life Technologies). gBlocks, що містять відкриті рамки зчитування (ORF), що кодують позаклітинний домен SEACAM, та мітку C терміналу LPETGGSHHHHHH, клонували у вектор експресії pcDNA3.4 (Invitrogen). Рекombінантні білки SEACAM-His експресували в клітинах Expi293F (Life Technologies) та очищали афінною хроматографією (ÄKTA Pure, GE Healthcare Life Sciences) з використанням нікелевої колонки (GE Healthcare Life Sciences). Елюат діалізували проти 300 mM NaCl 50 mM Трис pH 7,8 при 4°C. Неглікозильовані SEACAM експресували та очищали з культур *E. coli*. gBlocks, що містять ORF, які кодують N-кінцевий або A1B1A2-домени SEACAM1, та C-термінал LPETGGGS-6xHis, були клоновані у вектор pRSET-C. Вектори трансформувались у штам Rosetta Gami (RG) *E. coli*. Штами RG культивували в LB з додаванням 100 мкг/мл ампіциліну та 1 mM D-глюкози при 37°C протягом ночі та субкультивували 1:20 в LB з додаванням 1 mM D-глюкози при 37°C до OD₆₀₀=0,4. Експресію білка індукували культивуванням протягом 4 годин при 37°C після додавання 1 mM IPTG. Після лізису бактерій білки очищали за допомогою нікелевої колонки (GE Healthcare Life Sciences) та афінної хроматографії (ÄKTA Pure, GE Healthcare Life Sciences). Елюати діалізували проти 300 mM NaCl, 50 mM Трис, pH 7,8 при 4°C. Широкомасштабну експресію безтегового домену SEACAM1-N та точкових мутантів для використання в ізотермічній калориметричній титрації (ITC) та кристалізації здійснювали за допомогою векторів pET21d в *E. coli* та очищали, як описано раніше.

Експресія та очищення бактеріальних білків

Білки β , α та Rib очищали з культур GBS, як описано раніше. 58,59 Домени β білків (B6N, IgABR, B6C, IgSF та β 75KN) та R28 (R28-IgI3) клонували та експресували в *E. coli*. Було виявлено, що доменна структура IgSF знаходиться в області, що перекриває раніше опубліковані домени B6C (амінокислоти 226-434) та β 75KN (амінокислоти 434-788). 34 Тому ми оновили позначення доменів таким чином: - B6C являє собою амінокислоти 226-390, IgSF являє собою амінокислоти 391-503 та β 75KN являє собою амінокислоти 504-788. gBlocks, що містять ORF і С-кінцевий тег LPETGGGS-6xHis, клонували у вектор pRSET-C, використовуючи BamHI та NdeI. Вектори трансформували в штам RG. Штами RG культивували, індукували, збирали та лізували, як описано вище для неглікозильованих CEACAM. Супернатанти бактерій фільтрували, додавали 10 мМ імідазолу і пропускали через нікелеву колонку (GE Healthcare Life Sciences). Білки очищали за допомогою афінної хроматографії (ÄKTA Pure, GE Healthcare Life Sciences), елюювали імідазолом і діалізували проти 300 мМ NaCl 50 мМ Трис pH 7,8 при 4оС.

Зв'язування глікозильованих та неглікозильованих CEACAM до бактеріальних клітин

6×10^6 бактерій середньої логарифмічної фази росту інкубували з rCEACAM (1, 3, 5, 6 або 8), rCEACAM1-N або rCEACAM1-A1B1A2 при 4оС протягом 1 години зі струшуванням. Після промивання в PBS + 0,1% бичачого сироваткового альбуміну (BSA) rCEACAM на поверхні бактерії виявляли інкубацією з FITC- кон'югованим анти-HIS моноклональним антитілом (mAb) при 4оС протягом 1 години при струшуванні. Флуоресценцію бактерій вимірювали за допомогою проточного цитометричного аналізу після промивання та фіксації в 1% параформальдегіді (PFA). Для виявлення зв'язування rCEACAM з GBS за допомогою Вестерн-блот-аналізу бактеріальні гранули ресуспендували в 1x загрузочному буфері і нагрівали до 95оС протягом 10 хвилин. Лізати білків

розділяли під час SDS-PAGE у 12,5% поліакриламідному гелі при 270 В, переносили на нітроцелюлозні мембрани та зондували анти-СЕАСАМ1 (клон С51Х/8) mAb. Мембрани досліджували за допомогою кролячого анти-мишачого IgG-HRP та проявляли із використанням субстрату ECL.

Визначення експресії білку у GBS штаммах

Кролича антисироватка була створена проти β білка, як описано раніше. 5.8×10^6 бактерій середньої логарифмічної фази росту інкубували з інактивованою 0,1% кролячою анти- β сироваткою або нормальною кролячою сироваткою при 40С протягом 1 години зі струшуванням, промивали та інкубували в присутності козячого анти-кролячого PE-кон'югованого IgG при 40С протягом 1 години при струшуванні. Флуоресценцію бактерій вимірювали проточним цитометричним аналізом після промивання та фіксації в 1% PFA.

Визначення зв'язування СЕАСАМ1 та β білку

Вестерн-блот аналіз

Очищені білки GBS, або β білкові домени (B6N, IgABR, B6C, IgSF або β 75KN), відокремлювали нередукуючим SDS-PAGE, переносили на нітроцелюлозні мембрани, блокували 4% розчином нежирного сухого молока впродовж ночі при 40С, зондували з 10 μ г/мл rСЕАСАМ1-His (40С) та HRP-кон'югованого мишачого анти-His-IgG та проявляли з використанням реагенту Pierce ECL Western Blot Substrate Reagent (ThermoFisher Scientific).

Зв'язування бактеріальних білків до Binding СЕАСАМ1-покритих DB

rСЕАСАМ-His був прикріплений до нікелевих DB (D Dynabead His-tag pull-down & isolation, Invitrogen) за стандартними протоколами. Наявність СЕАСАМ1 було підтверджено інкубацією DB у присутності 5 мкг / мл анти-СЕАСАМ або ізотипного mAb контролю та виявлення за допомогою FITC-кон'югованого мишачого анти-His-IgG mAb. Щоб виявити зв'язування очищених білків GBS, 40 мкг DB інкубували у присутності 10 мкг / мл β білка і зондували 0,1% мишачою сироваткою або нормальною мишачою сироваткою та вторинними козячими анти-мишачими IgG-PE. Біотинільовані

білки (включаючи β -IgSF-біотин або HSA-біотин) інкубували з РЕ-кон'югованим стрептавідином на льоду протягом 10 хвилин. Це генерує комплекси біотин-стрептавідин на решті 3 сайтів зв'язування стрептавідину. Для виявлення зв'язування стрептавідин-кон'югованих білків (β -IgSF-біотин або HSA-біотин), 20 мкг DB інкубували з різними концентраціями стрептавідин-кон'югованого білку. Для розведення і промивання DB використовували PBS + 0,1% BSA, всі інкубації проводили протягом 1 години при 40C, а для всіх фіксацій використовували 1% PFA. Флуоресценцію вимірювали за допомогою проточної цитометрії. Для експериментів з інгібуванням DB, покриті CEACAM, попередньо інкубували з 5 мкг/мл анти-CEACAM1-N (клон CC1/3/5-Sab, LeukoCom, Ессен, Німеччина) або анти-CEACAM1-A1B1 mAb (клон В3- 17, LeukoCom, Ессен, Німеччина) або 10 мкг / мл НорQ протягом 1 години при 4°C.

Зв'язування CEACAM до покритих бактеріальними клітинами DB

Білки з С-біотинільованим терміналом прикріплювали до покритих стрептавідином DB (Dynabead M-280 Streptavidin, Invitrogen) згідно стандартних процедур. Для виявлення зв'язування rCEACAM-His або rCEACAM-N-His 3×10^5 DB інкубували у присутності 9 мкл білків (концентрації в діапазоні від 0,1 до 30 мкг/мл) і зондували з FITC-кон'югованими мишачими анти-His-IgG. У разі rSiglec-5-Fc зв'язування виявляли за допомогою анти-IgG-AF488. Для розведення і промивання DB використовували PBS + 0,1% BSA, всі інкубації проводили протягом 1 години при 40C, а для всіх фіксацій використовували 1% PFA. Флуоресценцію вимірювали за допомогою проточної цитометрії.

Ізотермічна титраційна калориметрія

Вимірювання ІТС проводили на приладі іТС200 (GE Healthcare). Зазвичай 500 мкМ неглікозильованих доменів CEACAM-N завантажували в шприц калориметра і в шприц завантажували 50 мкМ β -IgC2 білка. Всі вимірювання проводили при 25°C, зі швидкістю перемішування 750 об/хв, в

30 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, рН 7,5. Дані аналізували за допомогою програмного забезпечення Origin 7.0.

Адгезія GBS до епітелію

Клітинні лінії HeLa та яєчників китайського хом'яка (CHO), що експресують CEACAM, культивували, як описано раніше, 40,47,60 та висівали на 24-лункові планшети для культури тканин. Щільно злиті моношари інфікували бактеріями серединної логарифмічної фази росту (поглинання при OD600 = 0,4) штамамів GBS при кратності зараження (MOI) 10. Аналізи починали центрифугуванням протягом 2 хвилин при 700 об/хв і інкубували при 37°C з 5% CO₂ протягом 30 хв. Клітини промивали п'ять разів DMEM, відокремлювали 0,25% трипсином і лізували (PBS + 0,025% Triton-X). Приєднані бактерії були перераховані за допомогою послідовного розведення та культивування на агарі Тодда-Хьюїтта. У конкретних аналізах клітини попередньо інкубували з 5 мкг/мл mAb (анти-CEACAM1-N або анти-CEACAM1-A1B mAb) протягом 60 хвилин, або бактерії попередньо інкубували з rCEACAM1-N протягом 60 хвилин перед тим, як культивувати. Для конфокальної мікроскопії проводили зв'язування позначеним GBS з FITC при MOI 10 протягом 30 хвилин. Після п'ятикратного промивання PBS моношари фіксували 4% PFA протягом ночі перед фарбуванням ядер DAPI (Sigma Aldrich) та клітинних мембран AF647-кон'югованим агглютиніном зародків пшениці (ThermoFisher Scientific). Для проведення аналізів з відокремленими клітинними лініями CHO, клітинні моношари відокремлювали інкубацією при 37°C протягом 5 хвилин з розчином Accutase (BioLegend). Після промивання клітини ресуспендували до 3x10⁶ клітин/мл у DMEM, що містить 10% FCS. Для вимірювання експресії CEACAM клітини інкубували з мишачим клоном mAb CC1/3/5-Sab (виявляє N домен CC1, CC3 та CC5 людини) або 5C8C4 (виявляє домен CC5 людини A1B1A2B2A3B3; LeukoCom, Ессен, Німеччина) протягом 30 хвилин, промивали та інкубували з PE-кон'югованим кролячим анти-мишачим IgG. Для вимірювання зв'язування клітини інкубували з FITC-міченим GBS при MOI 10 протягом 30

хвилин при 40°C. Після промивання у PBS клітини фіксували в 4% PFA і флуоресценцію вимірювали за допомогою проточної цитометрії.

Кристалографія неглікозильованих CEACAM1-N та β -IgSF

Спочатку комплекс β -IgSF з CEACAM1-N готували шляхом змішування білків із незначним надлишком CEACAM1-N (співвідношення 1:1,1). Білок концентрували, використовуючи Amicon Ultra-4 10000 NMWL, а потім очищали за допомогою ексклюзивної хроматографії у колонці Superdex 200 (GE Healthcare), збалансованій 20 mM Трис, 150 mM NaCl, pH 7,5. Комплекс концентрували до 9 мг/мл та проводили скринінг проти комерційних екранів Wizards I / II / III / IV (Rigaku) та JCSG + (QIAGEN) із використанням кристалографічної системи Gryphon Protein (Art Robbins Instruments). Кристали були знайдені за кількох умов, але дифракція ніколи не була виявлена понад 8,0 Å в найкращому середовищі з 1,8 M сульфату амонію та 0,1 M цитрату натрію за pH 5,5. β -IgSF містить як С-термінальну сортазу, так і 6xHis мітку. Їх було видалено шляхом першої інкубації β -IgSF з карбоксипептидазою А (Sigma). 2 мл 6 мг/мл-1 β -IgSF інкубували з 1: 100 мас/мас карбоксипептидазою А протягом 24 годин при 4°C перед додаванням ще 1:100 мас/мас карбоксипептидази А та інкубацією протягом 24 годин при кімнатній температурі. Реакцію припиняли додаванням ЕДТА до кінцевої концентрації 5 mM. Білок концентрували за допомогою Amicon Ultra-4 10000 NMWL та очищували за допомогою ексклюзивної хроматографії за допомогою колонки Superdex 200 (GE Healthcare), збалансованої 20 mM Трис, 150 mM NaCl, pH 7,5. CEACAM1-N додавали з невеликим надлишком (співвідношення 1: 1,05) та очищали, як описано вище. Комплекс концентрували і знову аналізували при концентрації 7,5 мг/мл-1. Кристали знову утворювали в умовах 1,8 M сульфату амонію, 0,1 M цитрату натрію за pH 5,5, проте їх морфологія була іншою. Кристали були циро захищені в 30% об/об гліцерину. Типово спостерігали анізотропну дифракцію з дифракцією до ~ 3,0 Å у двох напрямках та 4,0 Å в іншому. Було зібрано два набори даних; (i) променеву лінію ID23-D на джерелі випереджаючого фотону та (ii)

променевої лінії 12-2 на джерелі світла стенфордського синхротронного випромінювання. Дані оброблялись та індексувались XDS, об'єднувались разом із BLEND перед масштабуванням та перетворенням на структурні фактори за допомогою Aimless. Коефіцієнт Метью передбачає п'ять комплексів в асиметричній одиниці. Молекулярна заміна з використанням MOLREP та CEACAM1-N (запис PDB 2gk2) як пошукової моделі в MOLREP виявила лише дві молекули CEACAM1. Дві копії комплексу свідчать про високий вміст розчинника (78%). Уточнення за допомогою REFMAC5 та візуалізація в Coot показали, що CEACAM1-N був добре розміщений, а залишкова електронна густина була характерна для білка β -IgI3. Модифікацію щільності проводили за допомогою Parrot (згладжування розчинником, узгодження гістограм та усереднення NCS) для вдосконалення карт. Магістраль β -IgSF була побудована вручну. Пошук PDBeFold на хребті показав, що це IgI-подібна складка, причому найближчою складкою у R.M.S.D є домен IgC2 Perlecan (запис PDB 1gl4). Складка Ig β -IgSF має попередньо недосліджену модифікацію (рис. 5B та 5C). Ми позначаємо це як домен I3-набору, а домен з β білком як β -IgI3. Це було використано для успішного розташування бічних ланцюгів, блокування реєстру та забезпечення додаткових обмежень під час вдосконалення в REFMAC5 за допомогою ProSMART. Комплекс (β -IgI3) - (CEACAM1-N) депонований у PDB із кодом входу 6V3P. Атомні контакти в комплексному інтерфейсі (β -IgI3) - (CEACAM1-N) були ідентифіковані за допомогою NCONT (CCP4) з відсіканням $4,0\text{\AA}$.61

Біоінформаційний аналіз

BLAST-аналіз амінокислотної послідовності β -IgI3 проводили для ідентифікації гомологів у бактеріальних білках і згодом вирівнювали за допомогою ClustalW. Філогенетичний аналіз проводили з використанням підходу "Максимальна правдоподібність" та 1000 реплікацій завантажувальної репліки в MEGA, 62, а отримане дерево відображалось з інтерактивним деревом версії 4. 63 Структуру гомологів IgI3 прогнозували у

SWISS-MODEL, використовуючи структуру β -IgI3 як вхідну. Далі були проаналізовані лише моделі, що мали показник QMEAN < -4,00. З'єднання структури β -IgI3 або передбаченої R28-IgI3 структури до SEACAM1-N моделювалося 50 разів за допомогою сервера ZDOCK, 64 в якому залишки SEACAM1-N F29, Q44, Q89, I91 та N95 були включені в якості контактних місць. Внесок вільної енергії в кожен імітацію було інтерпедентно розраховано за допомогою аналізу MM / GBSA на сервері HAWKDOCK.

Результати дослідження

Стрептокок групи В зв'язується з SEACAM1 за допомогою поверхневого білка

На сьогодні всі бактеріальні патогени людини, які взаємодіють з SEACAM1 людини, є грамнегативними бактеріями. Використовуючи глікозильований рекомбінантний SEACAM1 (rSEACAM1) (додатковий рис. 1A) та панель грампозитивних видів бактерій, ми спостерігали взаємодію rSEACAM1 зі штамами GBS, але не з будь-яким іншим грампозитивним видом зі скринінгу, включаючи *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. та *Staphylococcus* spp. (рис. 7.1A). Ми виявили, що зв'язування з SEACAM1 пов'язане з носійством гена *bas*, який кодує прикріплений до клітинної стінки поверхневий білок that, який зазвичай експресується у серотипів Ia, Ib, II та V GBS. (рис. 7.1B). Більше того, рівень експресії β білка, виявлений за допомогою анти- β -сироватки, корелює зі здатністю зв'язування з rSEACAM1 (рис. 7.1C). Видалення *bas* в референтному штамі GBS A909 повністю вимкнуло зв'язування rSEACAM1, в той час як комплементация вектором, що несе ген *bas*, відновила зв'язування rSEACAM1 (рис. 7.1D). Мутація інших поверхневих адгезинів або капсули GBS не впливала на взаємодію з rSEACAM1. Крім того, нам вдалося осадити rSEACAM1 за допомогою GBS A909 (рис. 7.1E), але не штаму *bas* (рис. 7.1F). Пряма взаємодія rSEACAM1 з очищеним β білком, але не з очищеними поверхневими білками GBS Rib або β , була продемонстрована за допомогою вестерн-блот-аналізу (рис. 7.1G). Нарешті, β білок зв'язувався із покритими SEACAM1 магнітними мітками,

але не зв'язувався з контрольними мітками, і ця взаємодія була залежною від концентрації (рис. 7.1H та 7.1I). Разом ці дані однозначно показують, що β білок специфічно зв'язується з CEACAM1 людини.

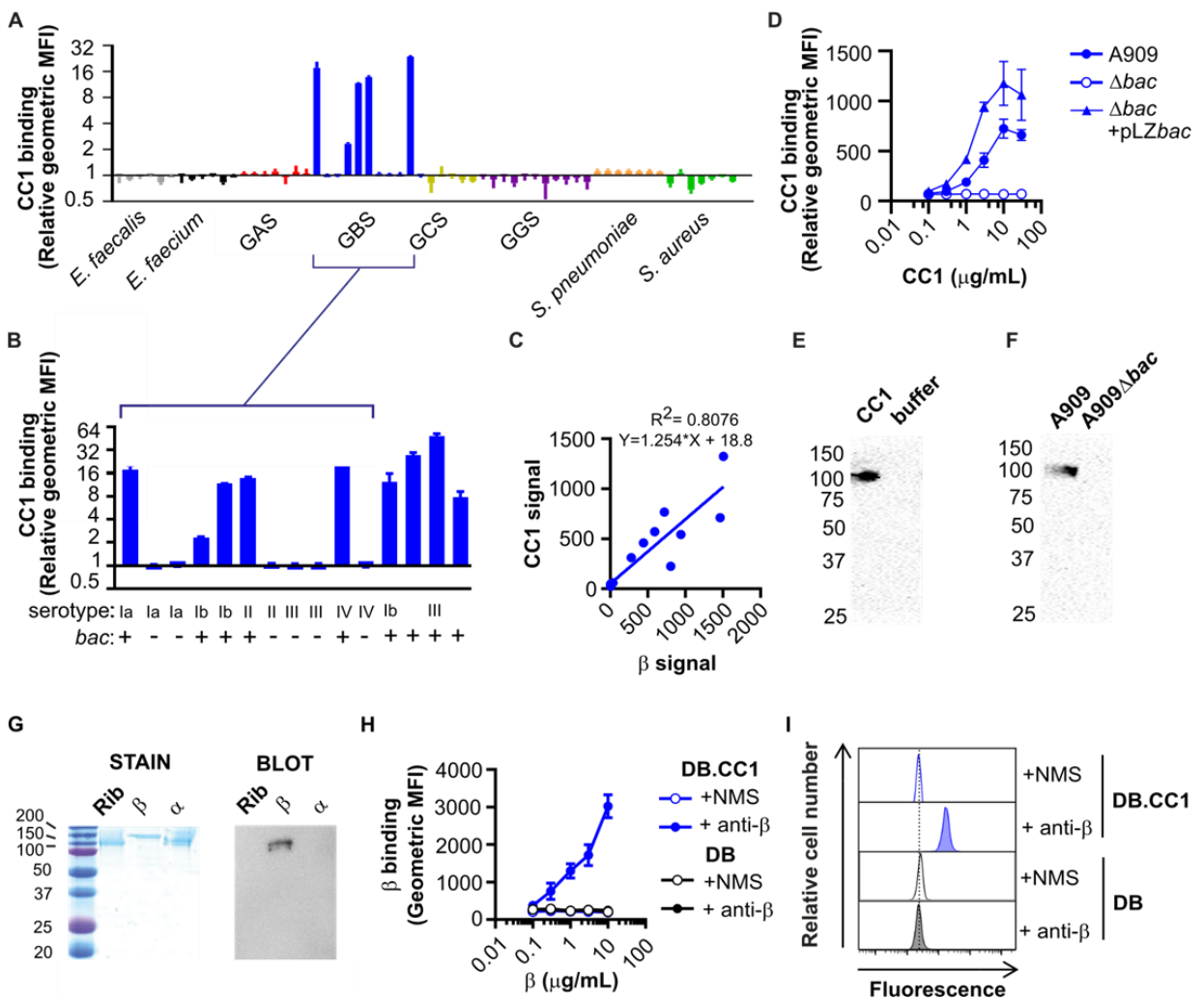


Рисунок 7.1 – Зв'язування людського CEACAM1 зі стрептококом групи В (GBS) через поверхнево експресований β білок

CEACAM1 зв'язується з IgSF доменом β білку

β білок взаємодіє з кількома білками імунної системи людини, включаючи фактор H, Siglec-5, Siglec-7, Siglec-14 та IgA, через різні домени (рис. 7.2A). 30–34 Для характеристики домену β білка, що взаємодіє з CEACAM1, ми експресували та очищали домени рекомбінантного β білка (B6N, IgABR, B6C, IgSF та β 75KN) з *E. coli* (рис. 7.2B) та тестували їх взаємодію з rCEACAM1. Ці домени включають частину β , яка називається

IgSF. Це пов'язане з тим, що раніше було запропоновано використовувати складку IgSF,^{29,35} яка складається з приблизно 100 амінокислот, які утворюють два β -листа та упаковуються «обличчям до обличчя». IgSF складки були виявлені в різних царствах, включаючи еукаріотів, прокаріотів, бактерій, вірусів, грибів та рослин. rCEACAM1 залежно від концентрації зв'язується з парамагнітними мітками (DB), покритими біотинільованим доменом IgSF, але не до DB, покритих іншими β білковими доменами або біотинільованим HSA (рис. 7.2C). В якості контролю ми включили rSiglec-5, який взаємодівав лише з DB, покритими доменом B6N, як описано раніше (рис. 7.2C) .³² Для подальшого тестування взаємодії між CEACAM1 та доменом IgSF ми покрили DB rCEACAM1, який взаємодівав з доменом IgSF, але не з HSA, приєднаним до стрептавідину (рис. 7.2D). Таким чином, домен IgSF β білку специфічно зв'язувався з CEACAM1 людини. Справді, структурні прогнози β -IgSF домену свідчать про схожість з V-набором Ig-домену, ідентифікованого та закріпленого на клітинній поверхні білку в *Streptococcus sanguinis* SrpA (рис. 7.2E) .³⁷ Однак rCEACAM1 не зв'язувався з поверхнею клітин штамів, що експресують SrpA – *S. sanguinis*. Ми позначили складку IgSF в β як β -IgSF. CEACAM1 має чотири Ig-подібні домени, включаючи N-кінцевий IgV-подібний домен і три домени IgC2, позначені A1, B1 і A2,1, що також є доменом для гомо- та гетерофільних взаємодій, причетних до CEACAM- опосередкованих функції. Всі бактеріальні ліганди, що відомі на сьогоднішній день, націлені на IgV-подібний домен. Для ідентифікації домену CEACAM1, до якого пов'язується β -IgSF, ми перевірили, чи можуть доменспецифічні моноклональні антитіла проти CEACAM1 (mAb) інгібувати взаємодію β -IgSF з покритим CEACAM1 DB. У цих дослідках лише блокування N-домену CEACAM1 інгібувало взаємодію з β -IgSF (Рис. 7.2F). Подібним чином білок *N. pylori* HopQ, який зв'язується з N-кінцевим IgV-подібним доменом, 26 блокував взаємодію β -IgSF-CEACAM1. Щоб перевірити пряму взаємодію з N-кінцевим доменом

СЕАСАМ1, ми нанесли покриття на DB з rСЕАСАМ1-N або rСЕАСАМ1-A1B1A2 та спостерігали залежне від концентрації зв'язування β -IgSF лише з DB, покритими rСЕАСАМ1-N (рис. 7.2G). У взаємному експерименті rСЕАСАМ1-N, але не rСЕАСАМ1-A1B1A2, зв'язаний з DB, покритим β -IgC2.

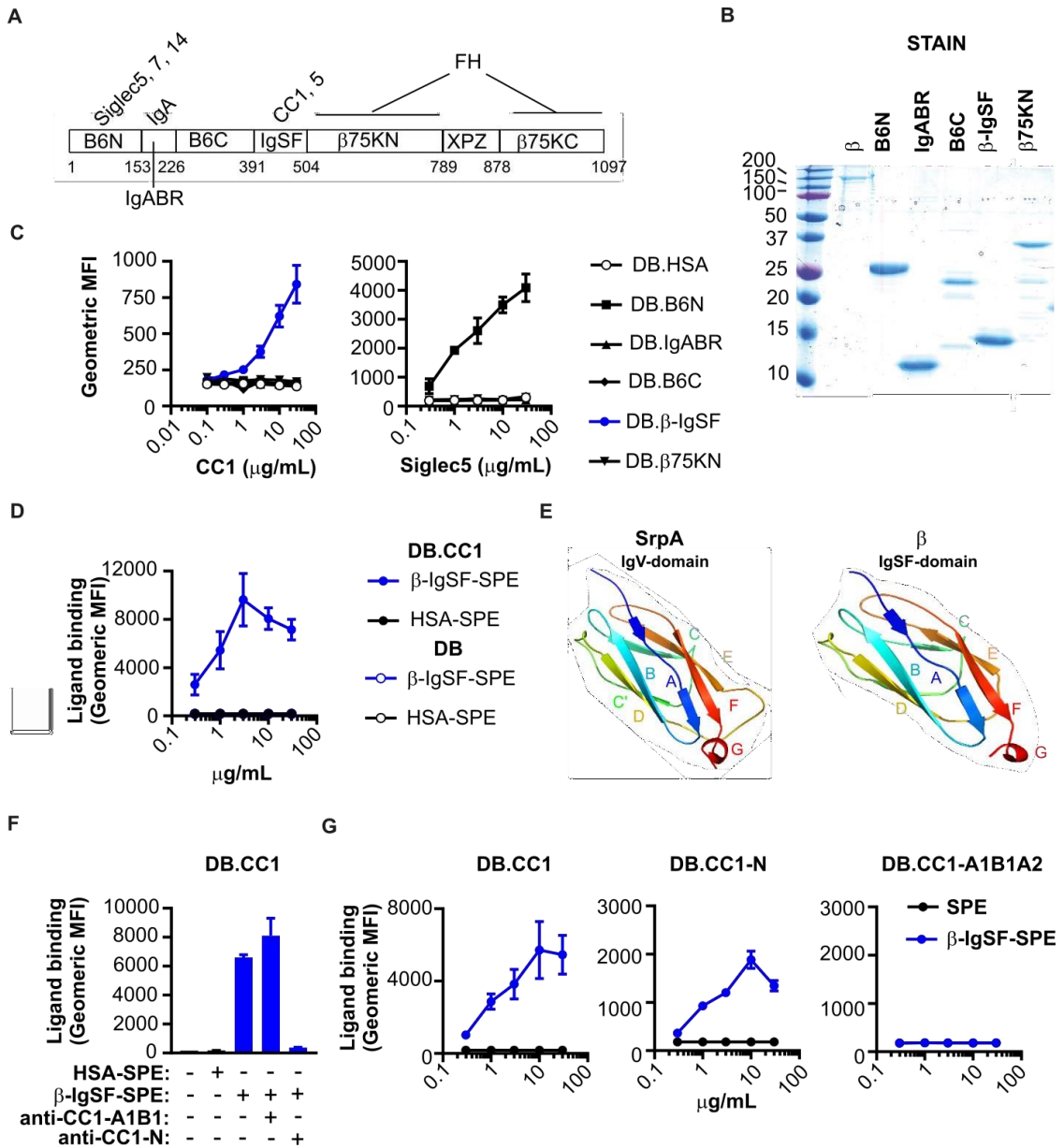


Рисунок 7.2 – Зв'язування домену IgSF у білку β GBS з N-кінцевим доменом СЕАСАМ

Домени β -IgSF з високою спорідненістю пов'язуються з СЕАСАМ1 та СЕАСАМ5 людини

Бактеріальні адгезини часто зв'язуються з N-кінцевим доменом не тільки CEACAM1, але також CEACAM3, CEACAM5 та CEACAM6, що відображає значну спорідненість їхньої послідовності (~ 90% ідентичності) та структурної гомології. Щоб з'ясувати профіль зв'язування CEACAM для β -IgSF, ми виміряли спорідненість β -IgSF до неглікозильованих N-кінцевих доменів цих п'яти CEACAM, отриманих від *E. coli*, за допомогою ізотермічної колориметрії (ITC) (рис. 7.3A). β -IgSF зв'язувався з високою спорідненістю до rCEACAM1-N ($KD = 96 \pm 2$ нМ) і rCEACAM5-N ($KD = 152 \pm 27$ нМ), але не зв'язувався з rCEACAM3-N, rCEACAM6-N або rCEACAM8-N. Спорідненість взаємодій (β -IgSF) - (CEACAM1-N) та (β -IgSF) - (CEACAM5-N) була порівняною із спорідненістю з іншими лігандами бактерій. Оскільки зв'язування β -IgSF слабше до ізольованого N-кінцевого домену порівняно з глікозильованим CEACAM1 (рис. 7.2G), інші домени CEACAM1 можуть стабілізувати взаємодію, як повідомляється про взаємодію NorQ-CEACAM1. Для підтвердження того, що профіль зв'язування CEACAM з білком дійсний для бактерій GBS, ми протестували зв'язування повнорозмірних глікозильованих rCEACAM з GBS за допомогою проточної цитометрії. β експресуючий штам GBS A909, взаємодіяв лише CEACAM1 та CEACAM5 (рис. 7.3B). Специфічність взаємодії була в основному підтверджена в більш широкій групі β -експресуючих штамів GBS, хоча існували варіації у зв'язуванні CEACAM5. Хоча деякі β -експресуючі штами GBS не зв'язували CEACAM5, домен β -IgSF демонстрував 100% збереження послідовності серед 57 білків GBS, виявлених за допомогою пошуку BLAST (дані не показані), вказуючи на те, що варіація внутрішньоштамбового зв'язування CEACAM5, швидше за все, пов'язана з диференціальною експресією β білку.

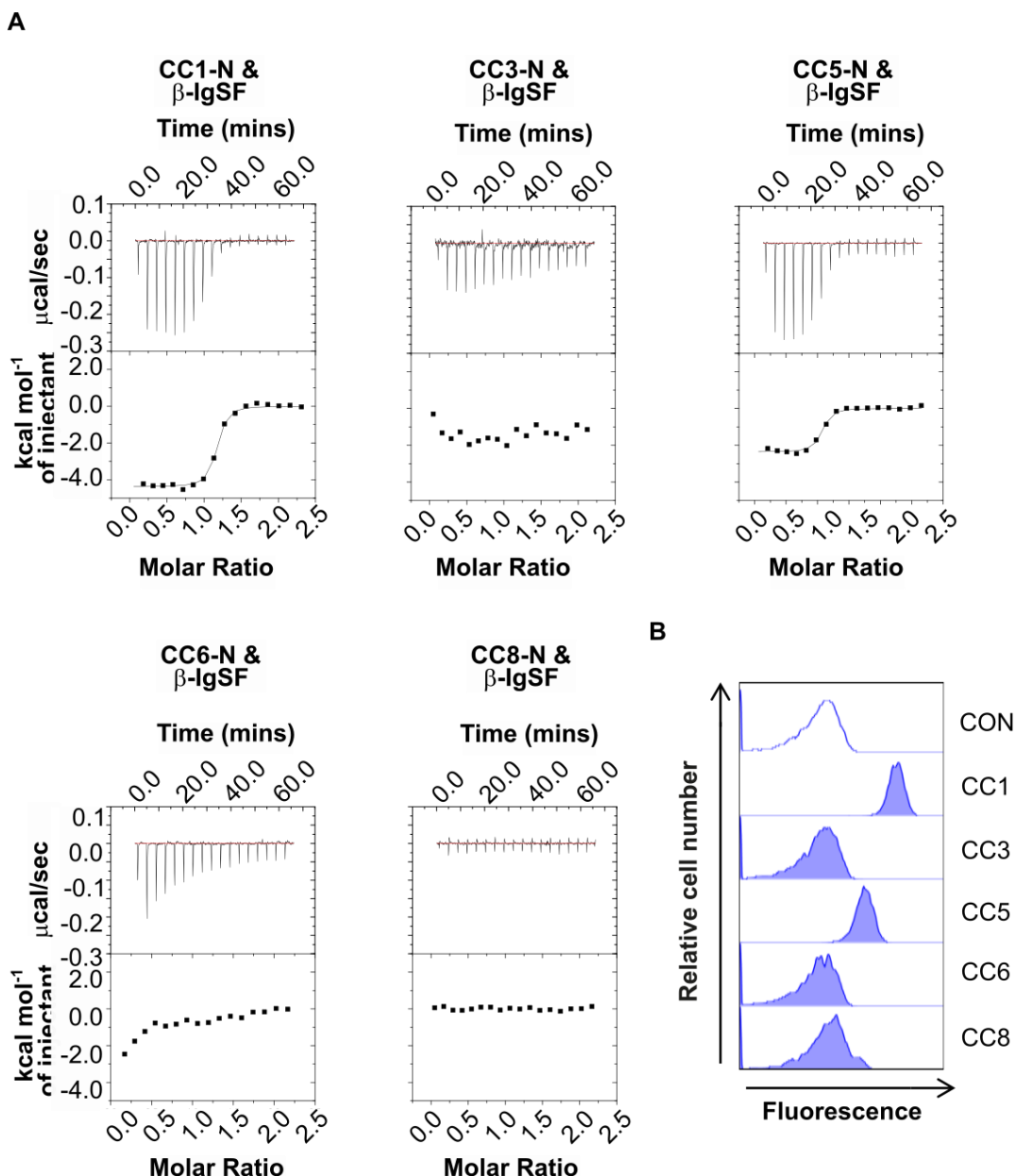


Рисунок 7.3 – β -IgSF зв'язується з високою спорідненістю до людських CEACAM1 та CEACAM5

Експресія людських CEACAM на епітеліальних клітинах підсилює адгезію GBS

Для аналізу здатності GB-експресуючих GBS використовувати людські CEACAM для клітинної адгезії, ми протестували зв'язування штаму A909 з добре охарактеризованими CEACAM-експресуючими клітинами HeLa (рис. 7.4A). Завдяки зв'язуванню з гCEACAM, більший відсоток інокуляту A909 був вилучений з клітин HeLa, що експресують CEACAM1- та CEACAM5, порівняно з усіма іншими клітинними лініями HeLa (рис. 7.4A). Підвищення

зв'язування GBS з людськими CEACAM1-експресуючими клітинами HeLa було підтверджено конфокальною мікроскопією (рис. 7.4B). Щоб переконатись у відсутності впливу клітинної лінії на зв'язування з CEACAM, ми оцінили адгезію GBS до клітин CHO.40 Також у цьому випадку більший відсоток інокуляту GBS був вилючений з клітин CHO, що експресують CEACAM1- та CEACAM5, у порівняння з усіма іншими клітинними лініями CHO (рис. 7.4C). З невідомих причин спостерігались значні зміни в адгезії GBS до клітин CHO, що експресують CEACAM1- та CEACAM5. Цю варіацію не можна віднести до нестабільної експресії CEACAM, оскільки наші клітинні лінії експресували CEACAM на стабільних рівнях. Адгезія штаму GBS A909 до клітини CHO, що експресує CEACAM1, була інгібована шляхом мутації гена *bas*, і фенотип міг бути рекапітульований доповненим мутантом (рис. 7.4D). Цей результат був підтверджений конфокальною мікроскопією. Разом з результатами, отриманими з чистими білками (рис. 7.2F), зв'язування β -експресуючого GBS з клітинами CHO, що експресують CEACAM1, пригнічувалось блокуванням домену CEACAM1-N специфічним mAb. Більше того, попередня інкубація A909 з rCEACAM1-N, але не rCEACAM8-N, погіршила адгезію до трансфектантів CHO, що експресують CEACAM1. Це вказує на те, що домени CEACAM1-N та β -IgSF відповідали за адгезійний фенотип. Щоб виключити можливість того, що відмінності в адгезії штамів дикого типу A909 і Δ bas до клітин CHO відображали варіацію міжштамових темпів росту під час адгезії при 37° C, ми розробили альтернативний аналіз, в якому оцінювали адгезію FITC-мічених штамів GBS до відокремлених клітинних ліній. під час інкубації при 4°С. Більший відсоток клітин CHO, що експресують CEACAM1, був FITC-позитивним при інкубації з A909 порівняно з контрольними клітинами (рис. 7.4E та 7.4F). Однак цього не спостерігалось для клітин CHO, що експресують CEACAM5, ймовірно, тому, що N-домен CEACAM5 був розщеплений під час процесу відшарування, що продемонстровано нездатністю mAb анти-CEACAM5-N зв'язуватися з цими клітинами. Як і очікувалось, адгезія FITC-міченого A909

до клітини CHO, що експресує CEACAM1, була інгібована шляхом мутації *bac* (рис. 7.4G). Таким чином, дані про клітинну адгезію вказують, що β -експресуючий GBS може використовувати людські рецептори CEACAM для клітинної адгезії.

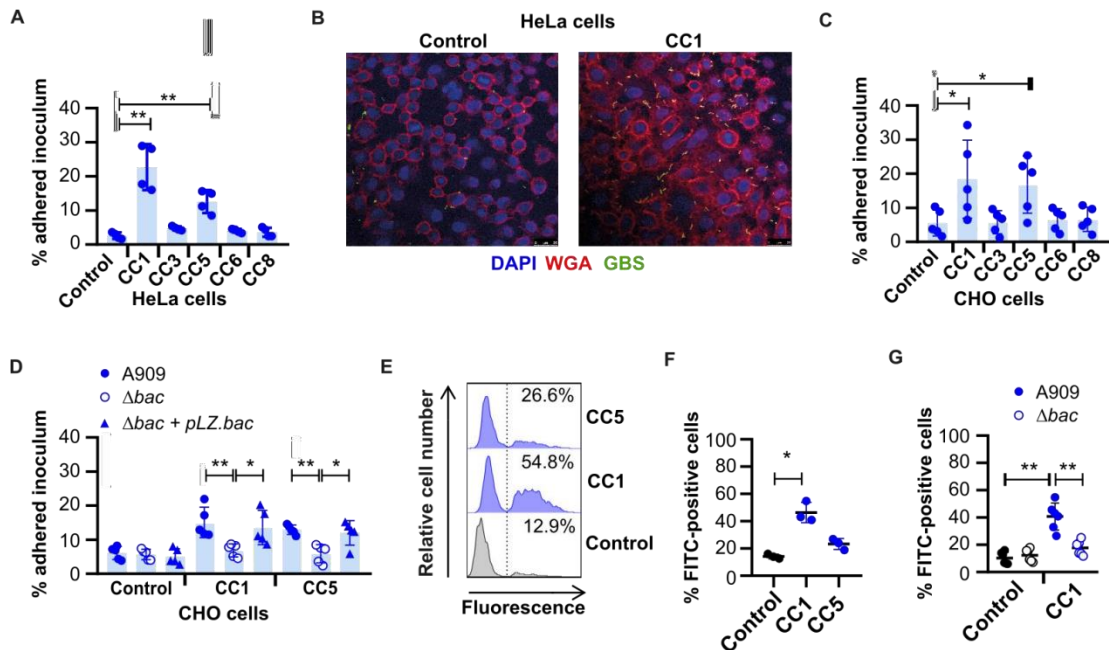


Рисунок 7.4 – GBS використовує людський CEACAM для посиленої адгезії до епітеліальних клітин

Кристалографія показує, що домен IgSF у β приймає нову складку Ig – складку IgI3

Щоб отримати уявлення про механізми зв'язування β -IgSF, ми мали з'ясувати його структуру. Однак ми могли визначити структуру в комплексі з CEACAM1-N з роздільною здатністю 3,0 Å (рис. 7.5A). Асиметрична одиниця містить дві молекули комплексу (β -IgSF) - (CEACAM1-N). Домен β -IgSF має характерні риси складки Ig, головним чином пари β -листів, побудованих з антипаралельних β -ланцюгів, які оточують гідрофобне ядро (рис. 7.5B). Домени IgSF можна класифікувати на V-набір (змінний), C-набір (постійний) або I-набір(проміжний), з диференціацією на основі кількості та розміщення β -ланцюгів між збереженим дисульфідним містком залишку цистеїну (рис. 7.5C). 41,42 V-набір Ig-домену містить 10 β -ниток з чотирма нитками, знайденими на одному листі (ABED), і шістьма нитками на іншому

(A' GFCC'C''). С-набір Ig-доменів не має A' і C'' ланцюги, і вони далі групуються в C1 або C2 на основі наявності або відсутності D-ланцюга відповідно. I-набір Ig-доменів не має ланцюга C' і класифікується на I1 або I2 на основі наявності або відсутності D-ланцюга відповідно. Домен β -IgSF має два β -листки, позначені ABED та A'GFC, з листками, з'єднаними петлями BC, EF, CD та AA' (рис. 7.5B). Отже, β -IgSF має топологію згину I-множини, яка найбільше нагадує область I1-множини (рис. 7.5C). Однак у β -IgSF не вистачає цистеїнів та дисульфідних містків, характерних для складок I-множини.⁴¹ Крім того, домен β -IgSF має усічений ланцюг C, за яким безпосередньо слідує 1,5-оборотна 1,5-спіраль (рис. 7.5C). Ці особливості не спостерігались у структурно охарактеризованих доменах IgI1 у базах даних DALI або PDBeFOLD, до яких β -IgSF має найбільшу схожість, включаючи колонієстимулювальний фактор 1 макрофагів (MCS-F) та молекули внутрішньоклітинної адгезії 3 (ICAM-3) (рис. 5D, 5E та 5F). Отже, топологія β -IgSF-домену являє собою нерозпізнаний раніше підтип IgI-складки, позначений тут як I3 домен Ig (IgI3). Відповідно, домен β тепер буде називатися β -IgI3. Унікальними особливостями цього домену є i) відсутність залишків цистеїну, ii) відсутність C'C'', iii) усічений C, за яким безпосередньо слідує 1,5-оборотна 1,5-спіраль. Слід зазначити, що унікальна область β -IgI3, що простягається від ланцюга C до D, має виступаючі гідрофобні залишки, такі як F42, розташований між C та α -спіраллю, L46, що знаходиться в α -спіралі, і V53, розташований у петлі CD (рис. 7.5G).

Ідентифікація взаємодіючих залишків у комплексі (β -IgI3) - (SEACAM1-N)

SEACAM утворюють свої гомофільні та гетерофільні взаємодії завдяки взаємодіям, обумовленими A'GFCC' в N-кінцевих доменах V-набору (рис. 7.5A та рис. 7.6A). Бактеріальні ліганди також зв'язуються з A'GFCC'. Ліганд H. pylori HopQ використовує пов'язаний механізм згортання та зв'язування 24, а модельоване приєднання показало, що ліганд E. coli AfaE зв'язується з димеризованим SEACAM інтерфейсом через нитки BE та петлю DE неповної

складки Ig. 25,43 Визначення структури методом рентгенівської кристалографії (рис. 7.6В) комплексу β -IgI3 та CEACAM1-N при роздільній здатності 3 Å показує що β -IgI3 зв'язується з гранню A'GFCC 'CEACAM1 через залишки, розташовані в ділянці ланцюгів C-D, включаючи α -спіраль (рис. 7.6С). 7.6В показує взаємодіючі залишки на поверхнях двох молекул. Зокрема, L46 в α -спіралі β -IgI3 взаємодіє під дією сил Ван-дер-Ваальса з F29 та L95 (відстані 3,11Å та 3,61Å), розташованих у ланцюгах C та G CEACAM1, відповідно.

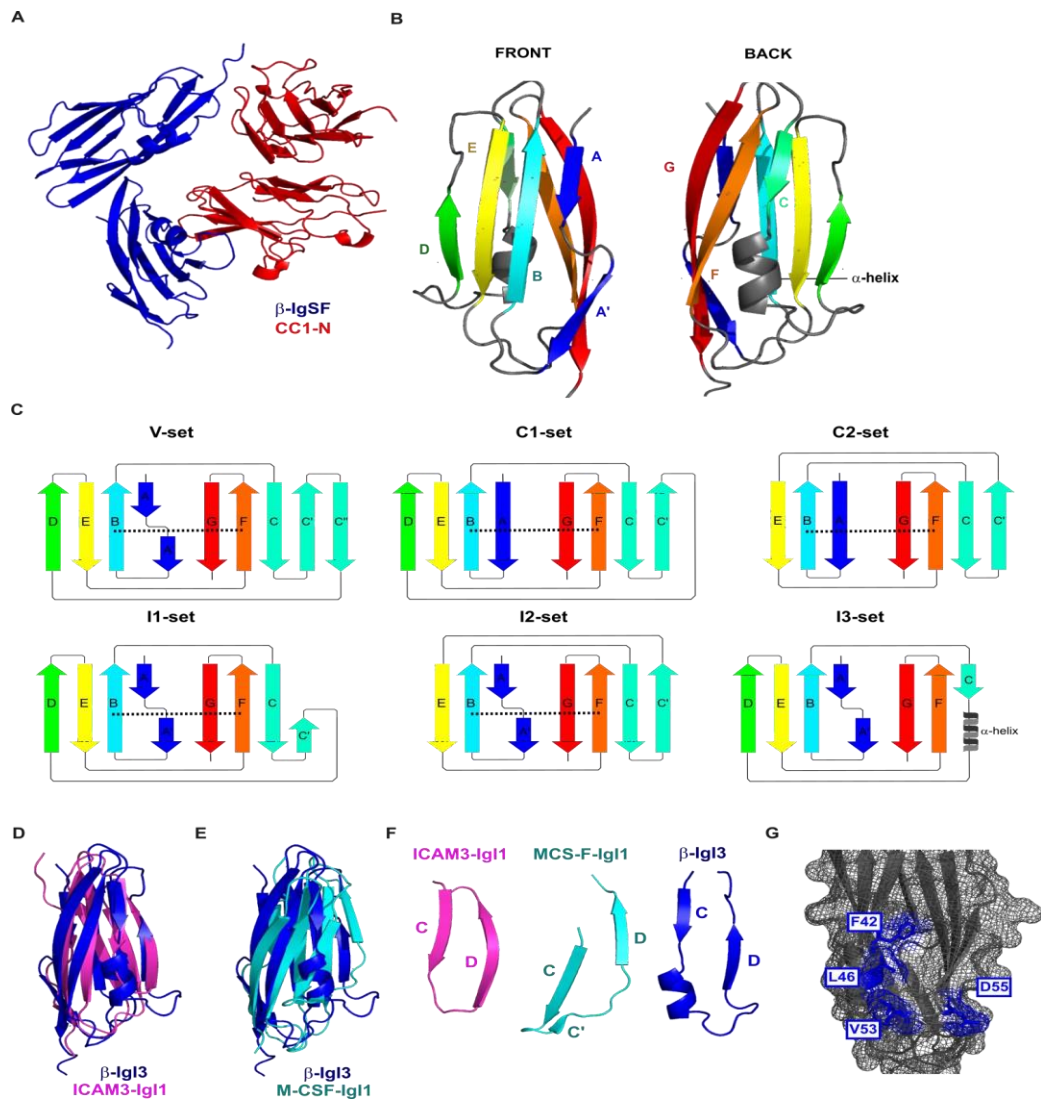


Рисунок 7.5 – Ig-подібний домен білка β являє собою новий Ig-складчастий підтип

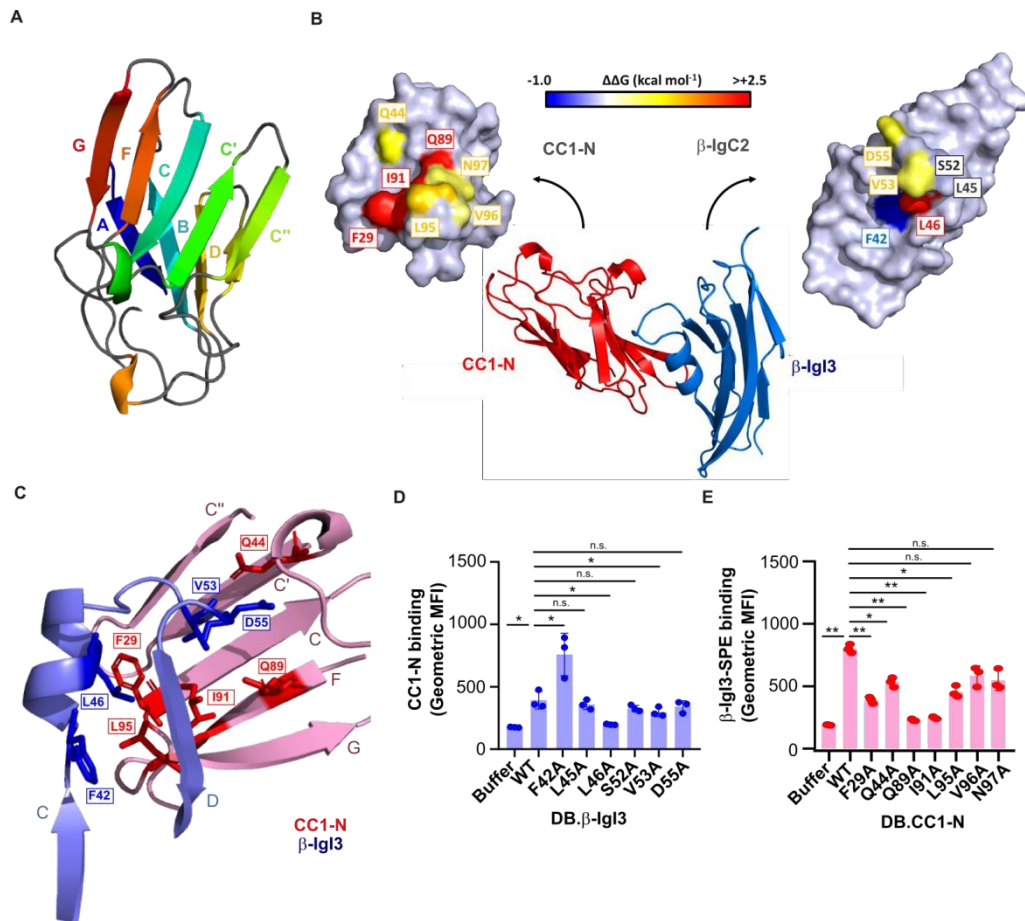


Рисунок 7.6 – Домен IgI3 β білка пов'язує SEACAM1 через унікальну α-спіраль та CD-петлю

Крім того, виступаючий залишок β-IgI3 V53 знаходиться в тісному контакті з I91 (відстань 3.16Å, нитка F) і S32 (відстань 3.36Å, нитка C) SEACAM1, D55 знаходиться в тісному контакті з Y34 (від C до C 'петлі) SEACAM1, а F42 знаходиться в тісному контакті з L95 (відстань 2.87Å, нитка G) SEACAM1. При зв'язуванні β-IgI3 не спостерігається конформаційних змін у SEACAM1. На підставі даних співкристалів ми припустили, що залишок β-IgI3 L46 є критичним для його зв'язування з SEACAM1-N через F29 та L95 (рис. 7.6C). Крім того, ми висунули гіпотезу, що залишок β-IgI3 V53 є критичним для контакту із залишком SEACAM1-N I91, а залишок β-IgI3 F42 є критичним для контакту із залишком SEACAM1-N L95. Ми генерували мутації аланіну в β-IgI3 у цих положеннях, а також у кількох інших місцях, які контактують з SEACAM1. Дослідження ІТС-зв'язку цих мутантів β-IgI3 з неглікозилітованим SEACAM1-N дикого типу

встановило, що мутант β -IgI3L46A не зміг зв'язатися з rCEACAM1-N. Три додаткові мутанти, β -IgI3L52A, β -IgI3V53A та β -IgI3D55A, мали знижену спорідненість до зв'язування rCEACAM1-N ($KD = 234 \pm 16$, 562 ± 44 , 690 ± 52 нМ, відповідно). Навпаки, β -IgI3F42A зв'язується з вищою спорідненістю ($KD = 16 \pm 15$ нМ). Крім того, ми перевірили здатність неглікозильованого rCEACAM1-N зв'язувати DB, покриту варіантами β -IgI3 (рис. 7.6D). У цьому аналізі rCEACAM1-N продемонстрував значно знижене зв'язування з DB, покритими β -IgI3L46A та β -IgI3V53A, та значно посилене зв'язування з DB, покритими β -IgI3F42A. Разом ці дані вказують на те, що залишки L46, L52, V53 та D55 β -IgI3 є критичними для зв'язування з CEACAM1. Спостерігалось, що ці залишки зберігаються у 57 послідовностях β білку (дані не наведені). Для CEACAM1-N кристалічна структура комплексу вказувала, що β -IgI3 взаємодіє з димерною поверхнею, контактуючи з кількома залишками, які є важливими для гомодимеризації CEACAM1 та для зв'язування з іншими бактеріальними адгезинами. Ми висунули гіпотезу, що залишки F29, I91 та L95 CEACAM1 є критичними для зв'язування з β -IgI3 (рис. 7.6C), і генерували мутанти аланіну в цих та кількох інших положеннях інтерфейсу гомодимеризації. В ІТС-аналізі з неглікозильованими білками CEACAM1-N, як CEACAM1-NF29A, так і CEACAM1-NI91A не змогли зв'язати β -IgI3. Крім того, CEACAM1-NQ89A також не мав здатності зв'язувати β -IgI3. Використання двох мутантів, CEACAM1-NQ44A та CEACAM1-NL95A, призвело до 10-кратного зменшення спорідненості до зв'язування ($KD = 996 \pm 116$ та 1350 ± 460 нМ відповідно), тоді як два інших мутанти, CEACAM1-NV96A та CEACAM1-NN97A, відображали лише незначне зниження (у 4 рази) спорідненості до зв'язування ($KD = 370 \pm 4$ та 490 ± 120 нМ відповідно). Крім того, ми перевірили здатність стрептавідин-зв'язаного β -IgI3, взаємодіяти з DB, покритими неглікозильованим диким та мутантними типами rCEACAM1-N (рис. 7.6E). Відмічено значне зменшення зв'язування CEACAM1-NF29A, CEACAM1-NQ89A та CEACAM1-NI91A, а також CEACAM1-NQ44A та CEACAM1-NL95A, підтверджуючи, що

залишки F29, Q89 та I91 є основними мішенями для зв'язування β -IgI3. I91 також був визначений критичним залишком SEACAM1 для взаємодії з *M. catarrhalis*, 18 *Neisseria spp.*, 22,23 *H. influenzae*, 16 та *Fusobacterium spp.*15 Хоча Q89 у SEACAM1 є критичним для взаємодії з β -IgI3 та іншими бактеріальними лігандами, Q89 не був у тісному контакті з будь-якими залишками β -IgI3. Можливо, що мутація залишку SEACAM1 Q89 утворює щілину, яку I91 намагається заповнити, що згодом запобігає його взаємодії з залишком β -IgI3 V53. Таким чином, контакт залишку L46 у β -IgI3 із залишком SEACAM1 F29, залишку V53 у β -IgI3 із залишком IAC SEACAM1 забезпечує критичну взаємодію. Додаткова стабільність забезпечується завдяки залишкам β -IgI3 F42 та D55.

Порівняння β -IgI3 та НорQ-зв'язувальних структур SEACAM1

Порівняння із комплексом НорQ-SEACAM1, який вперше продемонстрував структуру бактеріального адгезину, зв'язаного з SEACAM1, показує, що як β -IgI3, так і НорQ контактують з однаковим набором залишків, що беруть участь у димеризації SEACAM1 (додатковий рис. 7.6С). Однак НорQ не має Ig-подібної складки, але містить кілька α -спіралей, і його структура абсолютно не пов'язана зі структурою β -IgI3.24. НорQ використовує внутрішньо невпорядковану петлю, яка згортається в шпильку β і невелику спіраль на прив'язка до SEACAM1. Шпилька β розширює інтерфейс SEACAM1 A'GFCC'C'', тоді як невелика спіраль розсікає його. Навпаки, β -IgI3 взаємодіє через малу α спіраль і петлю, з одним залишком, L46, критичним для β -IgI3, для розміщення ніші на SEACAM1-N, утвореній F29 та I91 (рис. 7.6С). Мутація будь-якого з цих залишків у β -IgI3 або SEACAM1-N спричиняє утворення дефекту білково-білкового інтерфейсу або руйнування ніші, відповідно, скасовуючи зв'язування, як це спостерігалось в наших експериментах ІТС.

Гомологи β -IgI3 широко поширені у грам-позитивних бактеріях

Для кращого розуміння ролі унікальної структури β -IgI3 у бактеріальному патогенезі, ми дослідили розподіл цього домену в

бактеріальному царстві за допомогою аналізу BLAST. Послідовність, подібну або споріднену з β -IgI3, була ідентифікована у 296 білках, які, як передбачалося, експресуються грампозитивними бактеріями людини, включаючи кілька патогенів людини. Ці послідовності утворили кілька різних груп при аналізі максимальної вірогідності (рис. 7.7A). Домен IgI3 β був присутній у всіх групах, групі I IgI3, яка також включала послідовності від *Streptococcus oralis*. Друга велика група, група II, містила послідовності інших стрептококових патогенів людини, включаючи GBS, *S. pyogenes*, *S. dysgalactiae* та *S. mitis*. Крім того, послідовності, тісно пов'язані з групою II, були виявлені у *S. mitis*, *S. milleri* та *S. intermedius*, утворюючи групу III. Нарешті, багато гомологів β -IgI3 були присутні в білках різноманітної групи грампозитивних патогенів людини, включаючи *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae* та *Gemella haemolysans*. Крім того, був виявлений гомолог у *Gardnerella vaginalis* – грам-мінливої бактерії. Послідовності гомологів β -IgI3 були розташовані в білках, які, як передбачалося, будуть локалізовані на поверхні і закріплені в клітинній стінці бактерії. Ми передбачили третинну структуру 11 репрезентативних гомологічних послідовностей на основі кристалічної структури β -IgI3. Ці структури підтримували загальну складку IgI3, включаючи α -спіраль та петлю, розташовану між усіченим ланцюгом C та ланцюгом D, за винятком послідовності клади XV від *G. vaginalis*, у якої бракувало ланцюга C. Ці дані свідчать про те, що структура IgI3 широко розподілена в білках, прикріплених на поверхні бактеріальних клітинних стінок. Ми зосередили подальший аналіз на групі II, яка підтримує ключові структури IgI3, незважаючи на те, що вона має лише 40% ідентичності амінокислот з β -IgI3 (Рис. 7.7B). Ця група включає білок R28, який міститься в *S. pyogenes* і в GBS (де цьому ж білку було дано назву Alp3). R28 - це прикріплений до клітинної стінки білок, який не пов'язаний з білком β , за винятком домену IgI3. 29 Щоб зрозуміти здатність зв'язування SEACAM1 з гомологами β -IgI3, ми перевірили, чи були збережені критичні виступаючі залишки, розташовані між ланцюгами C та D в гомологах β -IgI3 (Рис. 7.5G).

Хоча СЕАСАМ1-зв'язуючі залишки β -IgI3 (F42, L46, V53 та D55) не зберігаються в R28-IgI3 (рис. 7.7C), два із залишків R28-IgI3, знайдені у відповідних положеннях, мали гідрофобну природу, як у β -IgI3. Цікаво, що додаткова варіація залишків була помітна серед інших доменів IgI3. Оскільки цей результат припустив, що гомологи IgI3, ймовірно, відрізнятимуться за своїми властивостями, стало особливо актуальним проаналізувати, чи розбіжний гомолог β -IgI3 у білку R28 зв'язує СЕАСАМ1.

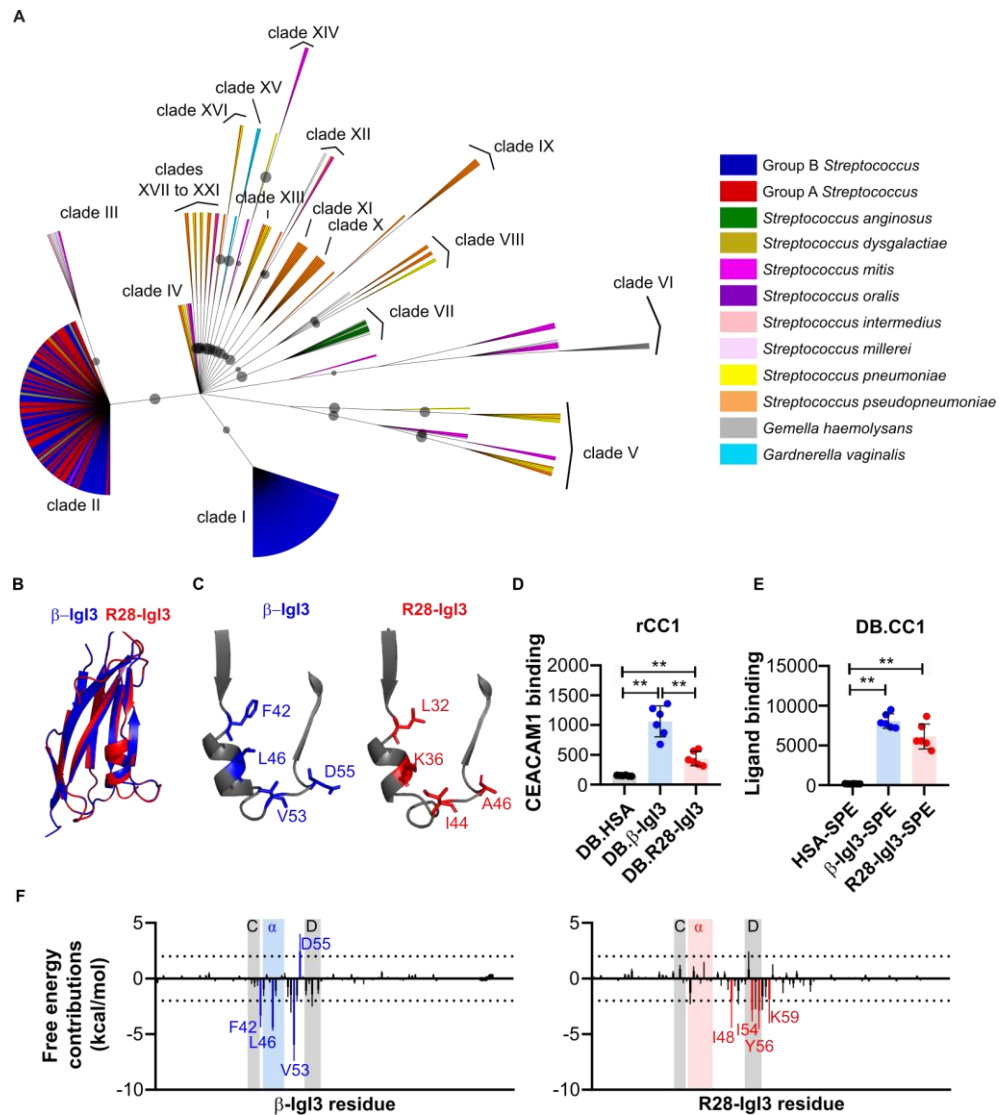


Рисунок 7.7 – Унікальна структура IgI3 виявлена в інших грамположитивних видах бактерій, які зв'язують СЕАСАМ1 людини β -IgI3 гомологи зв'язуються з людським СЕАСАМs

Для характеристики взаємодії домену IgI3 у R28 з СЕАСАМ1, ми очистили домен білка rR28-IgI3 та протестували взаємодію з rСЕАСАМ1.

DB, покриті біотинільованими R28-IgI3 та β -IgI3, але не HSA, взаємодіяли з rCEACAM1 (рис. 7.7D). У зворотному аналізі DB, покриті rCEACAM1, взаємодіяли з R28-IgI3 та β -IgI3, але не HSA, в зв'язаних зі стрептавідином (рис. 7.7E). Взяті разом із описаними вище структурними прогнозами, ці дані вказують на те, що складки IgI3 з більш широкого спектру грамположитивних бактеріальних патогенів можуть взаємодіати з CEACAM1 людини, але окремі домени IgI3 можуть взаємодіати з CEACAM1 людини по-різному. Щоб проаналізувати, чи β -IgI3 та R28-IgI3 взаємодіють по-різному з CEACAM1, ми змодельовали приєднання доменів IgI3 на людського CEACAM1 та дослідили розрахунки вільної енергії для встановлення ключових залишків IgI3 у комплексному утворенні. Залишки із залишковою вільною енергією зв'язування менше ніж -2,0 ккал / моль та більше 2 ккал / моль, ідентифікуються як ключові залишки та несприятливі залишки, відповідно. Моделювання з'єднання β -IgI3 та CEACAM1 підтвердило те, що F42, L46 та V53 були ключовими детермінантами зв'язування CEACAM1, тоді як D55 був несприятливим фактором (Рис. 7.7F). Вільна енергія зв'язування комплексів (R28-IgI3) - (CEACAM1-N) була сильною ($-31,02 \pm 6,70$ ккал / моль, $n = 50$). На відміну від β -IgI3, залишки, розташовані в α -спіралі R28-IgI3, не були визначені як ключові детермінанти зв'язування CEACAM1 (рис. 7.7F). Натомість критичні залишки R28-IgI3 (K48, I54, I56 та K59) знаходились лише в петлі CD та на ланцюзі D. Картування ключових залишків на поверхневій структурі свідчить про те, що β -IgI3 та R28-IgI3 націлені на CEACAM1 через різні грані складок IgI3. Таким чином, домени IgI3 у різних бактеріальних білках, ймовірно, взаємодіють із CEACAM1 людини за допомогою механізмів, які не є ідентичними, але використовують одну структурну складку.

Обговорення

У цьому дослідженні ми продемонстрували, що адгезини від бактеріальних патогенів людини містять домен із раніше нерозпізнаною Ig-подібною складкою I-набору. Молекулярний аналіз цього домену на

стрептококовий β білок продемонстрував, що він зв'язується з IgV-подібними N-кінцевими доменами CEACAM1 та CEACAM5 людини, а біохімічний аналіз продемонстрував, що взаємодія має високу специфічність та високу спорідненість. Виявлена бактеріальна Ig-подібна складка характеризується відсутністю залишків цистеїну та наявністю усіченого ланцюга C, за яким безпосередньо слідує 1,5-оборотна α -спіраль. Оскільки ця Ig-подібна складка I-набору має унікальні особливості, її позначили IgI3. Про відсутність залишків цистеїну в складках Ig вже повідомлялося, але на сьогоднішній день не було зафіксовано цього явища складках IgI. Крім того, часткове заміщення ланцюга C 1,5-оборотною α -спіраллю не було виявлено в жодній іншій складці Ig при пошуку PDB за допомогою HHpred. Хоча складка I-множини є найбільш поширеною Ig-складкою у білків IgSF людини, I-складчаста структура рідко зустрічаються в бактеріальних білках, що підтверджується негативним пошуком в базі даних SMART. Однак наш біоінформаційний аналіз та моделювання показали, що ключові структурні особливості складок IgI3 широко розподілені серед грампозитивних бактерій людини. Кристалічна структура комплексу продемонструвала, що β -IgI3 націлений на інтерфейс димеризації CEACAM1. Це узгоджується з даними щодо інших бактеріальних лігандів CEACAM, включаючи білки Opa *Neisseria spp*, UspA1 *M. catarrhalis*, HopQ *H. pylori* та Dr адгезини *E. coli*. Всі ці адгезини є структурно унікальними, що означає, що їх здатність зв'язувати CEACAM є прикладом конвергентної еволюції. Opa-білки *Neisseria spp* є мембранними білками, які зв'язуються з інтерфейсом димеризації CEACAM за допомогою двох гіперваріативних петель. UspA1 *M. catarrhalis* утворює тримерну спіральну котушку, яка приєднується до інтерфейсу димеризації CEACAM через невеликий вигин. HopQ *H. pylori* використовує невідповідно до порядку петлю для зв'язування інтерфейсу димеризації CEACAM. AfaE *E. coli* використовує Ig-подібний домен для націлювання на інтерфейс димеризації CEACAM, хоча він не використовує повну складку Ig і не використовує складку IgI3. Всі ці бактеріальні ліганди зв'язуються з гранню

СС'С " FG CEACAM, незважаючи на їх різноманітну структуру. Подібним чином, стрептококовий β -білок використовує домен IgI3 для зв'язування з CEACAM, і взаємодія досягається завдяки унікальним модифікаціям у складі IgI3. Зокрема, 1,5-оборотна α -спіраль у β -IgI3 взаємодіє з C та F ланцюгами CEACAM1, використовуючи залишок L46 для зв'язування, тоді як петля CD β -IgI3 також бере участь у критичній взаємодії з F ланцюгом. Отже, унікальні структурні особливості домену IgI3 відповідають за формування взаємодій з CEACAM1.

Наведені тут дані вперше показують, що грампозитивний бактеріальний збудник може зв'язуватися з різними CEACAM людини за допомогою міжбілкової взаємодії. Оскільки грамнегативні бактерії впливають на людські CEACAM для посиленої клітинної адгезії, цілком ймовірно, що β -експресуючі GBS також приєднуються до клітин людини через CEACAM, такий висновок підтверджують наші аналізи адгезії *in vitro*. Таким чином, CEACAM1 і CEACAM5 розширюють перелік білків поверхні клітин людини, які GBS може використовувати для адгезії. Потрібна подальша робота для визначення наслідків взаємодії між β -IgI3 та CEACAM1 поза клітинними лініями. Білок β GBS зазвичай експресується штамми серотипу Ia, Ib, II та V, а підвищена експресія асоціюється з підвищеною його вірулентністю. CEACAM1 є інгібуючим рецептором, який знижує активність та функцій імунних клітин. Оскільки β білок пов'язує CEACAM1, а також інгібуючі рецептори Siglec-5 та -7, які експресуються на лейкоцитах, ми припускаємо, що подвійне або багаторазове залучення цих інгібуючих рецепторів може індукувати потужні імуносупресивні сигнали через індукцію фосфорилування тирозину. Більше того, здатність β білка зв'язувати інші компоненти імунної системи людини, а саме. білки плазми IgA та фактор H вказує на здатність його діяти в якості мультитульного білку, який сприяє адгезії клітин до епітелію, пригнічує активність імунних клітин та сприяє зниженню імунітету. Подібним чином білок UspA1 *M. catharralis* має здатність зв'язуватися та взаємодіяти з CEACAM,

фібронектином, фактором комплементу C3 та регулятором комплементу C4BP. Цікаво, що β -IgI3-гомологи широко поширені в грампозитивних бактеріях, включаючи кілька патогенів людини, і структурне моделювання репрезентативних послідовностей передбачало, що гомологи мають структуру, що нагадує β -IgI3. Крім того, спостерігалось низьке збереження критичних залишків β -IgI3, що припускає, що кожна послідовність може мати різні властивості. Тим не менше, дослідження одного гомологічного домену з розбіжною послідовністю, R28-IgI3 в групі II, продемонстрували, що він може зв'язуватися з CEACAMs. Що цікаво, змодельоване зв'язування передбачає, що R28-IgI3 та β -IgI3 зв'язуються за допомогою альтернативних стратегій. Оскільки R28-IgI3-подібні послідовності були знайдені в білках від численних патогенів людини, зв'язування CEACAM може представляти невідому стратегію адгезії для ряду грампозитивних бактерій. Підводячи підсумок, наші дані демонструють, що домен з унікальною Ig-подібною складкою, складкою IgI3, сприяє зв'язуванню GBS з людськими рецепторами CEACAM. Більше того, гомологічні домени були ідентифіковані у різних грампозитивних бактеріальних патогенів, що дозволяє припустити, що багато грампозитивних бактеріальних патогенів використовують IgI3 домени для взаємодії з CEACAM. Характеристика цих доменів може призвести до кращого розуміння механізмів патогенності та може прокласти шлях до розробки нових терапевтичних підходів для запобігання інфекціям.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Gold, P., Freedman, S. O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med.* 1965;122(3):467–81.
2. Thomson D. M., Krupey J., Freedman S. O., Gold P. The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive tract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969;64(1):161–7.
3. Graham R. A., Wang S., Catalano P. J., Haller D. G. Postsurgical surveillance of colon cancer. *Ann Surg.* 1998 Jul;228(1):59–63.
4. Krupey J., Wilson T., Freedman S. O., Gold P. The preparation of purified carcinoembryonic antigen of the human digestive system from large quantities of tumor tissue. *Immunochemistry.* 1972;9(6):617–22.
5. Hammarstrom S., Engvall E., Sundblad G. Carcinoembryonic antigen (CEA): purification, structure and antigenic properties, in *Health Control in Detection of Cancer.* Stockholm: Almqvist & Wiksell; 1976. 24–39 p.
6. Von Kleist S., Chavanel G., Burtin P. Identification of an antigen from normal human tissue that crossreacts with the carcinoembryonic antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972; 69(9): 2492–2494.
7. Mach J. P., Pusztaszeri G. Carcinoembryonic antigen (CEA): Demonstration of a partial identity between CEA and a normal glycoprotein. *Immunochemistry.* 1972;9(10):1031–4.
8. MacSween J. M., Warner N. L., Bankhurst A. D., Mackay I. R. Carcinoembryonic antigen in whole serum. *Br J Cancer.* 1972;26(5):356–60.
9. Sorokin J. J., Sugarbaker P. H., Zamcheck N., Pisick M., Kupchik H. Z., Moore F. Serial carcinoembryonic antigen assays. Use in detection of cancer recurrence. *JAMA.* 1974;228(1):49–53.
10. Svenberg T. Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile. Isolation and partial characterization. *Int J Cancer.* 1976;17(5):588–96.

11. Svenberg T., Hammarstrom S., Hedin A. Purification and properties of biliary glycoprotein I (BGP I) – immunochemical relationship to carcinoembryonic antigen. *Mol Immunol.* 1979;16(4):245–52.

12. Drzeniek Z., Lamerz R., Fenger U., Wagener C., Haubeck H.D. Identification of membrane antigens in granulocytes and colonic carcinoma cells by a monoclonal antibody specific for biliary glycoprotein, a member of the carcinoembryonic antigen family. *Cancer Lett.* 1991;56:173–9.

13. Stoffel A., Neumaier M., Gaida F.J., Fenger U., Drzeniek Z., Haubeck H.D., Wagener C. Monoclonal, anti-domain and anti-peptide antibodies assign the molecular weight 160,000 granulocyte membrane antigen of the CD66 cluster to a mRNA species encoded by the biliary glycoprotein gene, a member of the carcinoembryonic antigen gene family. *J Immunol.* 1993;150(11):4978–84.

14. Hinoda Y., Neumaier M., Hefta S. A., Drzeniek Z., Wagener C., Shively L., Hefta L. J., Shively J. E., Paxton R. J. Molecular cloning of a cDNA coding biliary glycoprotein I: Primary structure of a glycoprotein immunologically crossreactive with carcinoembryonic antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:6959–63.

15. Svenberg T., Hammarström S., Zeromski J. Immunofluorescence studies on the occurrence and localization of the CEA-related biliary glycoprotein I (BGP I) in normal human gastrointestinal tissues. *Clin Exp Immunol.* 1979;36:436–41.

16. Prall F., Nollau P., Neumaier M., Haubeck H. D., Drzeniek Z., Helmchen U., Loning T., Wagener C. CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 1996;44(1):35–41.

17. Cheung P. H., Culic O., Qiu Y., Earley K., Thompson N., Hixson D. C., Lin S. H. The cytoplasmic domain of C-CAM is required for C-CAM-mediated adhesion function: Studies of a C-CAM transcript containing an unspliced intron. *Biochem J.* 1993; 295(Pt 2): 427–35.

18. Shively J. E., Beatty J. D. CEA-related antigens: Molecular biology and clinical significance. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1985;2(4):355–99.

19. Oikawa S., Nakazato H., Kosaki G. Primary structure of human carcinoembryonic antigen (CEA) deduced from cDNA sequence. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;142(2):511–8.

20. Zimmermann W., Ortlieb B., Friedrich R., Von Kleist S. Isolation and characterization of cDNA clones encoding the human carcinoembryonic antigen reveal a highly conserved repeating structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84(9): 2960–4.

21. Kuroki M., Yamanaka T., Matsuo Y., Ohtani T., Matsuo Y., Minowada J., Misumi Y., Oikawa S., Nakazato H., Matsuoka Y. Characterization of a species of non-specific cross-reacting antigen (NCA) expressed by human monocytic cell lines: Structure and expression during cell differentiation. *Int J Cancer*. 1994;56(6):886–91.

22. Kuroki M., Arakawa F., Matsuo Y., Oikawa S., Nakazato H., Matsuoka Y. Three novel molecular biliary glycoprotein cDNA isoforms deduced clones from a leukocyte library. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;176(2):578–85.

23. Behr T. M., Sharkey R. M., Juweid M. E., Dunn R. M., Ying Z., Zhang C. H., Siegel J. A., Gold D. V., Goldenberg D. M. Factors influencing the pharmacokinetics, dosimetry and diagnostic accuracy of radioimmunodetection and radioimmunotherapy of carcinoembryonic antigen-expressing tumors. *Cancer Res*. 1996;56(8):1805–16.

24. Ychou M., Pelegrin A., Faurous P., Robert B., Saccavini J. C., Guerreau D., Rossi J. F., Fabbro M., Buchegger F., Mach J. P., Artus J. C. Phase II radioimmunotherapy Iodine--labeled anti-CEA monoclonal antibody F6 F(ab9)2 in patients with non-resectable liver metastases from colorectal cancer. *Int J Cancer*. 1998;75(4):615–9.

25. Delgado C., Pedley R. B., Herraiz A., Boden R., Boden J. A., Keep P. A., Chester K. A., Fisher D., Begent R. H., Francis G. E. Enhanced tumour specificity

of an anti-carcinoembryonic antigen Fab' fragment by polyethylene glycol) (PEG) modification. *Br J Cancer*. 1996;73(2):175–82.

26. Kammerer R., Zimmermann W. Coevolution of activating and inhibitory receptors within mammalian carcinoembryonic antigen families. *BMC Biol*. 2010;8:12.

27. Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: Structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol*. 1999;9(2):67–81.

28. Olsen A., Teglund S., Nelson D., Gordon L., Copeland A., Georgescu A., Carrano A., Hammarstrom S. Gene organization of the pregnancy-specific glycoprotein region on human chromosome 19: Assembly and analysis of a 700 kb cosmid contig spanning the region. *Genomics*. 1994;23(3):659–68.

29. Zimmermann W., Weber B., Ortlieb B., Rudert F., Schempp W., Fiebig H. H., Shively J. E., Von Kleist S., Thompson J. Chromosomal localization of the carcinoembryonic antigen gene family and differential expression in various tumors. *Cancer Res*. 1988;48(9):2550–4.

30. Frängsmyr L., Israelsson A., Teglund S., Matsunaga T., Hammarström S. Evolution of the Carcinoembryonic antigen family. *Tumor Biol*. 2000;21:63-81.

31. Zebhauser R., Kammerer R., Eisenried A., McLellan A., Moore T., Zimmermann W. Identification of a novel group of evolutionarily conserved members within the rapidly diverging murine Cea family. *Genomics*. 2005;86:566–80.

32. Beauchemin N., Arabzadeh A. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2013;32(3-4):643–71.

33. Beauchemin N., Draber P., Dveksler G., Gold P., Gray-Owen S., Grunert F., Hammarström S., Holmes K. V., Karlsson A., Kuroki M., Lin S. H., Lucka L., Najjar S. M., Neumaier M., Obrink B., Shively J. E., Skubitz K. M., Stanners C. P., Thomas P., Thompson J. A., Virji M., Von Kleist S., Wagener C., Watt S.,

Zimmermann W. Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp Cell Res.* 1999;252(2):243–9.

34. Obrink B. CEA adhesion molecules: Multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9(5):616–26.

35. Kuespert K., Pils S., Hauck C. R. CEACAMs: Their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(5):565–71.

36. Waterhouse R., Ha C., Dveksler G. S. Murine CD9 is the receptor for pregnancy-specific glycoprotein 17. *J Exp Med.* 2002;195(2):277–82.

37. Zhou G. Q., Baranov V., Zimmermann W., Grunert F., Erhard B., Mincheva-Nilsson L., Hammarstrom S., Thompson J. Highly specific monoclonal antibody demonstrates that pregnancy-specific glycoprotein (PSG) is limited to syncytiotrophoblast in human early and term placenta. *Placenta.* 1997;18(7):491–501.

38. Thompson J., Grunert F., Zimmermann W. Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal.* 1991;5(5):344–66.

39. Muturi H. T., Dreesen J. D., Nilewski E., Jastrow H., Giebel B., Ergun S., Singer B.B. Tumor and endothelial cell-derived microvesicles carry distinct CEACAMs and influence T-cell behavior. *PLoS One.* 2013;8(9):e74654.

40. Naghibalhossaini F., Stanners C. P. Minimal mutations are required to effect a radical change in function in CEA family members of the Ig superfamily. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 5):761–9.

41. Singer B. B. CEACAMs. In book: *Encyclopedia of Signaling Molecules.* Springer International Publishing, New York; 2016. 1–9 p.

42. Zhou H., Fuks A., Alcaraz G., Bolling T. J., Stanners C. P. Homophilic adhesion between Ig superfamily carcinoembryonic antigen molecules involves double reciprocal bonds. *J Cell Biol.* 1993;122(4):951–60.

43. Voges M., Bachmann V., Naujoks J., Kopp K., Hauck C. R. Extracellular IgC2 constant domains of CEACAMs mediate PI3K sensitivity during uptake of pathogens. *PLoS One.* 2012;7(6):e39908.

44. Human CEACAM1 splice variants [Internet]. 2018[updated 2018 June 19; cited 2020 Feb 9]. Available from: <http://www.carcinoembryonic-antigen.de/human/human-ceacam1-splice-variants.html>
45. Bjerner J., Lebedin Y., Bellanger L., Kuroki M., Shively J. E., Varaas T., Nustad K., Hammarström S., Borner O. P. Protein epitopes in carcinoembryonic antigen. Report of the ISOBM TD8 workshop. *Tumour Biol.* 2002;23(4):249–62.
46. Matsuoka Y., Matsuo Y., Okamoto N., Kuroki M., Kuroki M., Ikehara Y. Highly effective extraction of carcinoembryonic antigen with phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Tumour Biol.* 1991;12(2):91–8.
47. Song J. H., Cao Z., Yoon J. H., Nam S. W., Kim S. Y., Lee J. Y., Park W. S. Genetic alterations and expression pattern of CEACAM1 in colorectal adenomas and cancers. *Pathol Oncol Res.* 2011;17:67–74.
48. Ortenberg R., Galore-Haskel G., Greenberg I., Zamlin B., Sapoznik S., Greenberg E., Barshack I., Avivi C., Feiler Y., Zan-Bar I., Besser M. J., Azizi E., Eitan F., Schachter J., Markel G. CEACAM1 promotes melanoma cell growth through Sox-2. *Neoplasia.* 2014;16(5):451–60.
49. Watt S. M., Teixeira A. M., Zhou G. Q., Doyonnas R., Zhang Y., Grunert F., Blumberg R. S., Kuroki M., Skubitz K. M., Bates P. A. Homophilic adhesion of human CEACAM1 involves N-terminal domain interactions: structural analysis of the binding site. *Blood.* 2001;98(5):1469–79.
50. Cheung P. H., Luo W., Qiu Y., Zhang X., Earley K., Millirons P., Lin S. H. Structure and function of C-CAM1. The first immunoglobulin domain is required for intercellular adhesion. *J Biol Chem.* 1993;268(32):24303–10.
51. Klaile E., Vorontsova O., Sigmundsson K., Müller M. M., Singer B. B., Ofverstedt L. G., Svensson S., Skoglund U., Obrink B. The CEACAM1 N-terminal Ig domain mediates cis- and trans-binding and is essential for allosteric rearrangements of CEACAM1 microclusters. *J Cell Biol.* 2009;187(4):553–67.
52. Singer B. B., Scheffrahn I., Kammerer R., Suttorp N., Ergun S., Slevogt H. Deregulation of the CEACAM expression pattern causes undifferentiated cell growth in human lung adenocarcinoma cells. *PLoS One.* 2010;5(1): e8747.

53. Singer B. B., Lucka L. CEACAM1. UCSD-Nature Molecule Pages [Internet]. UCSD Nature Molecule Pages. 2005 [updated 2005 Dec 5; cited 2019 Feb 18]. Available from: <https://doi.org/10.1038/mp.a003597.01>.

54. Klaile E., Müller M. M., Kannicht C., Otto W., Singer B. B., Reutter W., Öbrink B., Lucka L. The cell adhesion receptor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 regulates nucleocytoplasmic trafficking of DNA polymerase delta-interacting protein 38. *J Biol Chem*. 2007;282(36):26629–40.

55. Singer B. B., Scheffrahn I., Heymann R., Sigmundsson K., Kammerer R., Öbrink B. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression and signaling in human, mouse, and rat leukocytes: evidence for replacement of the short cytoplasmic domain isoform by glycosylphosphatidylinositol-linked proteins in human leukocytes. *J Immunol*. 2002;168(10):5139–46.

56. Duxbury M. S., Ito H., Ashley S. W., Whang E. E. CEACAM6 cross-linking induces caveolin-1-dependent, Src-mediated focal adhesion kinase phosphorylation in BxPC3 pancreatic adenocarcinoma cells. *J Biol Chem*. 2004;279(22):23176–82.

57. Nouvion A. L., Oubaha M., Leblanc S., Davis E. C., Jastrow H., Kammerer R, Breton V, Turbide C, Ergun S, Gratton JP, Beauchemin N (2010) CEACAM1: a key regulator of vascular permeability. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 24):4221–30.

58. Oikawa S., Kuroki M., Matsuoka Y., Kosaki G., Nakazato H. Homotypic and heterotypic Ca(++)-independent cell adhesion activities of biliary glycoprotein, a member of carcinoembryonic antigen family, expressed on CHO cell surface. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;186(2):881–7.

59. Hayhurst G. P., Lee Y. H., Lambert G., Ward J. M., Gonzalez F. J. Hepatocyte nuclear factor 4 α (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol*. 2001;21:1393–403.

60. Najjar S. M., Boisclair Y. R., Nabih Z. T., Philippe N., Imai Y., Suzuki Y., Suh D. S., Ooi G. T. Cloning and characterization of a functional promoter of the rat pp120 gene, encoding a substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 1996;271:8809–17.

61. Battle M. A., Konopka G., Parviz F., Gaggl A. L., Yang C., Sladek F. M., Duncan S. A. Hepatocyte nuclear factor 4 α orchestrates expression of cell adhesion proteins during the epithelial transformation of the developing liver. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:8419–24.
62. Bonzo J. A., Ferry C. H., Matsubara T., Kim J. H., Gonzalez F. J. Suppression of hepatocyte proliferation by hepatocyte nuclear factor 4 α in adult mice. *J Biol Chem*. 2012;287:7345–56.
63. Yin L., Ma H., Ge X., Edwards P. A., Zhang Y. Hepatic hepatocyte nuclear factor 4 α is essential for maintaining triglyceride and cholesterol homeostasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:328–36.
64. Dery K. J., Gaur S., Gencheva M., Yen Y., Shively J. E., Gaur R. K. Mechanistic control of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) splice isoforms by the heterogeneous nuclear ribonuclear proteins hnRNP L, hnRNP A1, and hnRNPM. *J Biol Chem*. 2011;286(18):16039–51.
65. Turbide C., Kunath T., Daniels E., Beauchemin N. Optimal ratios of biliary glycoprotein isoforms required for inhibition of colonic tumor cell growth. *Cancer Res*. 1997;57(13):2781–8.
66. Gaur S., Shively J.E., Yen Y., Gaur R. K. Altered splicing of CEACAM1 in breast cancer: Identification of regulatory sequences that control splicing of CEACAM1 into long or short cytoplasmic domain isoforms. *Mol Cancer*. 2008;7:46.
67. Wang L., Lin S. H., Wu W. G., Kemp B. L., Walsh G. L., Hong W. K., Mao L. C-CAM1, a candidate tumor suppressor gene, is abnormally expressed in primary lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2000;6(8):2988–93.
68. Brummer J., Neumaier M., Gopfert C., Wagener C. Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene*. 1995;11(8):1649–55.

69. Muller M. M., Klaile E., Vorontsova O., Singer B. B., Obrink B. Homophilic adhesion and CEACAM1-S regulate dimerization of CEACAM1-L and recruitment of SHP-2 and c-Src. *J Cell Biol.* 2009;187(4):569–81.

70. Ling Y., Wang J., Wang L., Hou J., Qian P., Xiang-dong W. Roles of CEACAM1 in cell communication and signaling of lung cancer and other diseases. *Cancer Metastasis Rev.* 2015;34(2):347–57.

71. Singer B. B., Scheffrahn I., Obrink B. The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation. *Cancer Res.* 2000;60:1236–44.

72. Kirshner J., Schumann D., Shively J.E. CEACAM1, a cell-cell adhesion molecule, directly associates with annexin II in a three-dimensional model of mammary morphogenesis. *J Biol Chem.* 2003;278:50338–45.

73. Schumann D., Chen C. J., Kaplan B., Shively J. E. Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 directly associates with cytoskeleton proteins actin and tropomyosin. *J Biol Chem.* 2001;276:47421–33.

74. Markel G., Achdout H., Katz G., Ling K. L., Salio M., Gruda R., Gazit R., Mizrahi S., Hanna J., Gonen-Gross T., Arnon T. I., Lieberman N., Stren N., Nachmias B., Blumberg R. S., Steuer G., Blau H., Cerundolo V., Mussaffi H., Mandelboim O. Biological function of the soluble CEACAM1 protein and implications in TAP2-deficient patients. *Eur J Immunol.* 2004;34(8):2138–48.

75. Draberova L., Cerna H., Brodska H., Boubelik M., Watt S. M., Stanners C. P., Dráber P. Soluble isoforms of CEACAM1 containing the A2 domain: Increased serum levels in patients with obstructive jaundice and differences in 3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine moiety. *Immunology.* 2000;101(2): 279–87.

76. Mach P., Gellhaus A., Prager S., Moore T., Wennemuth G., Kimmig R., Koninger A., Singer B. B. Soluble CEACAM1 and CEACAM6 are differently expressed in blood serum of pregnant women during normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2017;78:e12700.

77. Markel G., Ortenberg R., Seidman R., Sapoznik S., Koren-Morag N., Besser M. J., Bar J., Shapira R., Kubi A., Nardini G., Tessone A., Treves A. J., Winkler E., Orenstein A., Schachter J. Systemic dysregulation of CEACAM1 in melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59(2):215–30.

78. Simeone D. M., Baoan J., Banerjee M., Arumugham T., Li D., Anderson M. A., Bamberger A. M., Greenson J., Brand R. E., Ramachandran V., Logsdon C. D. CEACAM1, a novel serum biomarker for pancreatic cancer. *Pancreas.* 2007;34(4):436–43.

79. Tilki D., Singer B. B., Shariat S. F., Behrend A., Fernando M., Irmak S., Buchner A., Hooper A. T., Stief C. G., Reich O., Ergün S. CEACAM1: A novel urinary marker for bladder cancer detection. *Eur Urol.* 2010;57(4):648–54.

80. Horst A. K., Wagener C. CEA-related CAMs. In *Handbook of experimental pharmacology*. Springer International Publishing, New York; 2004. 283–341 p.

81. Gray-Owen S. D., Blumberg R. S. CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(6):433–46.

82. Hunter I., Lindh M., Obrink B. Differential regulation of C-CAM isoforms in epithelial cells. *J Cell Sci.* 1994;107:1205–16.

83. Sundberg U., Beauchemin N., Obrink B. The cytoplasmic domain of CEACAM1-L controls its lateral localization and the organization of desmosomes in polarized epithelial cells. *J Cell Sci.* 2004;117(pt 7):1091–04.

84. Sundberg U., Obrink B. CEACAM1 isoforms with different cytoplasmic domains show different localization, organization and adhesive properties in polarized epithelial cells. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 6):1273–84.

85. Odin P., Öbrink B. Dynamic Expression of the Cell Adhesion Molecule Cell-CAM 105 in Fetal and Regenerating Rat Liver. *Exp Cell Res.* 1986;164:103–14.

86. Daniels E., Létourneau S., Turbide C., Kuprina N., Rudinskaya T., Yazova A., Holmes K. V., Dveksler G., Beauchemin N. Biliary Glycoprotein 1 expression during embryogenesis: Correlation with events of epithelial differentiation,

mesenchymal-epithelial interactions, absorption, and myogenesis. *Dev Dyn.* 1996;206:272–90.

87. Mitchell C., Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat Protoc.* 2008;3:1167–70.

88. Michalopoulos G. K. Liver regeneration after partial hepatectomy: Critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol.* 2010;176:2–13.

89. Briese J., Oberndorfer M., Patschenik C., Schulte H. M., Makriqiannakis A., Loning T., Bamberger A. M. Osteopontin is colocalized with the adhesion molecule CEACAM1 in the extravillous trophoblast of the human placenta and enhances invasion of CEACAM1-expressing placental cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:5407–13.

90. Horst A. K., Najjar S. M., Wagener C., Tiegs G. CEACAM1 in Liver Injury, Metabolic and Immune Regulation. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):3110.

91. Rueckschloss U., Kuerten S., Ergün S. The role of CEA-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) in vascular homeostasis. *Histochem Cell Biol.* 2016;146(6):657–71.

92. Stern N., Markel G., Arnon T. I., Gruda R., Wong H., Gray-Owen S. D., Mandelboim O. Carcinoembryonic antigen (CEA) inhibits NK killing via interaction with CEA-related cell adhesion molecule 1. *J Immunol.* 2005;174(11):6692–701.

93. Singer B. B., Opp L., Heinrich A., Schreiber F., Binding-Liermann R., Berrocal-Almanza L. C., Heyl K. A., Muller M. M., Weimann A., Zweigner J., Slevogt H. Soluble CEACAM8 interacts with CEACAM1 inhibiting TLR2-triggered immune responses. *PLoS One.* 2014; 9(4): e94106.

94. Markel G., Seidman R., Stern N., Cohen-Sinai T., Izhaki O., Katz G., Besser M., Treves A. J., Blumberg R. S., Loewenthal R., Mandelboim O., Orenstein A., Schachter J. Inhibition of human tumor-infiltrating lymphocyte effector functions by the homophilic carcinoembryonic cell adhesion molecule 1 interactions. *J Immunol.* 2006;177(9):6062–71.

95. Ortenberg R., Sapir Y., Raz L., Hershkovitz L., Ben Arav A., Sapoznik S., Barshack I., Avivi C., Berkun Y., Besser M. J., Ben-Moshe T., Schachter J., Markel G. Novel immunotherapy for malignant melanoma with a monoclonal antibody that blocks CEACAM1 homophilic interactions. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(6):1300–10.

96. Agenus acquires novel antibodies to immuno-oncology target CEACAM1 [Internet]. 2015 [updated 2015 July 20; cited 2020 Mar 3]. Available from: <https://www.businesswire.com/news/home/20150720005321/en/Agenus-Acquires-Antibodies-Immuno-oncology-Target-CEACAM1>.

97. Study of CM-24 (MK-6018) Alone and In Combination With Pembrolizumab (MK-3475) in Participants With Selected Advanced or Recurrent Malignancies (MK-6018-001) [Internet]. 2017 [updated 2017 Mar 15; cited 2019 Nov 7]. Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/history/NCT02346955?V_16=View.

98. Alegre M. L., Shiels H., Thompson C. B., Gajewski T. F. Expression and function of CTLA-4 in Th1 and Th2 cells. *J Immunol.* 1998;161(7):3347–56.

99. Riley J. L. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev.* 2009;229(1):114–25.

100. Liu J., Di G., Wu C. T., Hu X., Duan H. Development and evaluation of a novel anti-colorectal cancer monoclonal antibody, WL5. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;432(2):370–7.

101. Sanders D. S., Evans A. T., Allen C. A., Bryant F. J., Johnson G. D., Hopkins J., Stocks S. C., Marsden J. R., Kerr M. A. Classification of CEA-related positivity in primary and metastatic malignant melanoma. *J Pathol.* 1994;172(4):343–8.

102. Humphries M. J. Towards a structural model of an integrin. *Biochem Soc Symp.* 1999;65:63–78.

103. Kelleher M., Singh R., O'Driscoll C. M., Melgar S. Carcinoembryonic antigen (CEACAM) family members and Inflammatory Bowel Disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019;47:21–31.

104. Jin Y., Lin L., Lin Y, Zheng C. Exogenous carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 suppresses 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in mice. *J Surg Res.* 2015;195(1):113–20.

105. Metildi C. A., Kaushal S., Snyder C. S., Hoffman R. M., Bouvet M. Fluorescence-guided surgery of human colon cancer increases complete resection resulting in cures in an orthotopic nude mouse model. *J Surg Res.* 2013;179:87–93.

106. Metildi C. A., Kaushal S., Pu M., Messer K. A., Luiken G. A., Moossa A. R., Hoffman R. M., Bouvet M. Fluorescence-guided Surgery with a Fluorophore-conjugated Antibody to Carcinoembryonic Antigen (CEA), that Highlights the Tumor, Improves Surgical Resection and Increases Survival in Orthotopic Mouse Models of Human Pancreatic Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2014;21:1405–11.

107. Menen R. S., Kaushal S., Snyder C. S., Talamini M. A., Hoffman R. M., Bouvet M. Detection of colon cancer metastases with fluorescence laparoscopy in orthotopic nude mouse models. *Arch Surg.* 2012;147:876–80.

108. Hollandsworth H. M., Amirfakhri S., Filemoni F., Schmitt V., Wennemuth G., Schmidt A., Hoffman R. M., Singer B. B., Bouvet M. Anti-carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule antibody for fluorescence visualization of primary colon cancer and metastases in patient-derived orthotopic xenograft mouse models. *Oncotarget.* 2020;11(4):429–39.

109. Neumaier M., Paululat S., Chan A., Matthaes P., Wagener C. Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(22):10744–8.

110. Busch C., Hanssen T. A., Wagener C., OBrink B. Down-regulation of CEACAM1 in human prostate cancer: correlation with loss of cell polarity, increased proliferation rate, and Gleason grade 3 to 4 transition. *Hum Pathol.* 2002;33(3):290–8.

111. Cruz P. V., Wakai T., Shirai Y., Yokoyama N., Hatakeyama K. Loss of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression is an adverse prognostic factor in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2005;104(2):354–60.

112. Yang C., He P., Liu Y., He Y., Yang C., Du Y., Zhou M., Wang W., Zhang G., Wu M., Gao F. Down-regulation of CEACAM1 in breast cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2015;47(10):788–94.

113. Bamberger A. M., Riethdorf L., Nollau P., Naumann M., Erdmann I., Götze J., Brümmer J., Schulte H. M., Wagener C., Löning T. Dysregulated expression of CD66a (BGP, C-CAM), an adhesion molecule of the CEA family, in endometrial cancer. *Am J Pathol*. 1998;152(6):1401–6.

114. Kunath T., Ordoñez-García C., Turbide C., Beauchemin N. Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene*. 1995;11(11):2375–82.

115. Wang J. L., Sun S. Z., Qu X., Liu W. J., Wang Y. Y., Lv C. X., Sun J. Z., Ma R. Clinicopathological significance of CEACAM1 gene expression in breast cancer. *Chin J Physiol*. 2011;54(5):332–8.

116. Kang W. Y., Chen W. T., Wu M. T., Chai C. Y. The expression of CD66a and possible roles in colorectal adenoma and adenocarcinoma. *Int J Colorectal Dis*. 2007;22(8):869–74.

117. Thies A., Moll I., Berger J., Wagener C., Brümmer J., Schulze H. J., Brunner G., Schumacher U. CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease. *J Clin Oncol*. 2002;20(10):2530–6.

118. Laack E., Nikbakht H., Peters A., Kugler C., Jasiewicz Y., Edler L., Brümmer J., Schumacher U., Hossfeld D. K. Expression of CEACAM1 in adenocarcinoma of the lung: A factor of independent prognostic significance. *J Clin Oncol*. 2002;20(21):4279–84.

119. Shi J. F., Xu S. X., He P., Xi Z. H. Expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1(CEACAM1) and its correlation with angiogenesis in gastric cancer. *Pathol Res Pract*. 2014;210(8):473–6.

120. Li N., Yang J. Y., Wang X. Y., Wang H. T., Guan B. X., Zhou C. J. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 is expressed and as a function histotype in ovarian tumors. *Ann Diagn Pathol*. 2016;20:7–12.

121. Wang F. F., Guan B. X., Yang J. Y., Wang H. T., Zhou C. J. CEACAM1 is overexpressed in oral tumors and related to tumorigenesis. *Med Mol Morphol.* 2017;50(1):42–51.

122. Huang J., Simpson J. F., Glackin C., Riethorf L., Wagener C., Shively J. E. Expression of biliary glycoprotein (CD66a) in normal and malignant breast epithelial cells. *Anticancer Res.* 1998;18(5A):3203–12.

123. Kiriya S., Yokoyama S., Ueno M., Hayami S., Ieda J., Yamamoto N., Yamaguchi S., Mitani Y., Nakamura Y., Tani M., Mishra L., Shively J. E., Yamaue H. CEACAM1 long cytoplasmic domain isoform is associated with invasion and recurrence of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2014;21 Suppl 4(0 4):S505–14.

124. Li C., Chen C. J., Shively J. E. Mutational analysis of the cytoplasmic domain of CEACAM1-4L in humanized mammary glands reveals key residues involved in lumen formation: Stimulation by Thr-457 and inhibition by Ser-461. *Exp. Cell Res.* 2009;315:1225–33.

125. Kirshner J., Chen C. J., Liu P., Huang J., Shively J. E. CEACAM1-4S, a cell-cell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(2):521–6.

126. Kirshner J., Hardy J., Wilczynski S., Shively J. E. Cell-cell adhesion molecule CEACAM1 is expressed in normal breast and milk and associates with beta1 integrin in a 3D model of morphogenesis. *J Mol Histol.* 2004;35(3):287–99.

127. Liu Q., Yang Y. M., Zhang Q. H., Zhang T. G., Zhou Q., Zhou C. J. Inhibitor of differentiation is overexpressed with progression of benign to malignant lesions and related with carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 distribution in mammary glands. *Ann Diagn Pathol.* 2011;15(1):30–6.

128. Ouyang X. S., Wang X., Ling M. T., Wong H. L., Tsao S. W., Wong Y. C. Id-1 stimulates serum independent prostate cancer cell proliferation through inactivation of p16(INK4a)/pRB pathway. *Carcinogenesis.* 2002;23(5):721–5.

129. Yang C., He P., Liu Y., He Y., Yang C., Du Y., Zhou M., Wang W., Zhang G., Wu M., Gao F. Assay of serum CEACAM1 as a potential biomarker for breast cancer. *Clin Chim Acta*. 2015;450:277–81.
130. Yang C., Cao M., Liu Y., He Y., Yang C., Du Y., Wang W., Zhang G., Wu M., Zhou M., Gao F. Inhibition of cell invasion and migration by CEACAM1-4S in breast cancer. *Oncol Lett*. 2017;14(4):4758–66.
131. Marx M., Dorsch O. pp60c-src is required for the induction of a quiescent mesangial phenotype. *Kidney Int*. 1997;51(1):110–8.
132. Wegwitz F., Lenfert E., Gerstel D., von Ehrenstein L., Einhoff J., Schmidt G., Logsdon M., Brandner J., Tiegs G., Beauchemin N., Wagener C., Deppert W., Horst A. K. CEACAM1 controls the EMT switch in murine mammary carcinoma in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2016;7(39):63730-46.
133. Bajaj J., Maliekal T. T., Vivien E., Pattabiraman C., Srivastava S., Krishnamurthy H., Giri V., Subramanyam D., Krishna S. Notch signaling in CD66+ cells drives the progression of human cervical cancers. *Cancer Res*. 2011;71(14):4888–97.
134. Islam E. A., Anipindi V. C., Francis I., Shaik-Dasthagirisaheb Y., Xu S., Leung N., Sintsova A., Amin M., Kaushic C., Wetzler L. M., Gray-Owen S. D. Specific Binding to Differentially Expressed Human Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecules Determines the Outcome of *Neisseria gonorrhoeae* Infections along the Female Reproductive Tract. *Infect Immun*. 2018;86(8):e00092–18.
135. Horne A. W., White J. O., Lalani el-N. Adhesion molecules and the normal endometrium. *BJOG*. 2002;109(6):610–7.
136. Singer B. B. CEACAMs. In book: *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer International Publishing, New York; 2016. 1–9 p.
137. Briese J., Schulte H. M., Bamberger C. M., Löning T., Bamberger A. M. Expression pattern of osteopontin in endometrial carcinoma: correlation with expression of the adhesion molecule CEACAM1. *Int J Gynecol Pathol*. 2006;25(2):161–9.

138. Bamberger A. M., Briese J., Götze J., Erdmann I., Schulte H. M., Wagener C., Nollau P. Stimulation of CEACAM1 expression by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and calcium ionophore A23187 in endometrial carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2006;27(3):483–90.

139. Lauke H., Kilic N., Bozorgzad R., Fernando M., Neshat-Vahid S., Pottek T., Ergun S. Expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) in normal human Sertoli cells and its up-regulation in impaired spermatogenesis. *Mol Hum Reprod*. 2004;10(4):247–52.

140. Greenberg N. M., DeMayo F., Finegold M. J., Medina D., Tilley W. D., Aspinall J. O., Cunha G. R., Donjacour A. A., Matusik R. J., Rosen J. M. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(8):3439–43.

141. Tilki D., Irmak S., Oliveira-Ferrer L., Hauschild J., Miethe K., Atakaya H., Hammerer P., Friedrich M. G., Schuch G., Galalae R., Stief C. G., Kilic E., Huland H., Ergun S. CEA-related cell adhesion molecule-1 is involved in angiogenic switch in prostate cancer. *Oncogene*. 2006;25(36):4965–74.

142. Volpert O., Luo W., Liu T. J., Estrera V. T., Logothetis C., Lin S. H. Inhibition of prostate tumor angiogenesis by the tumor suppressor CEACAM1. *J Biol Chem*. 2002;277(38):35696–702.

143. Muller M. M., Klaile E., Vorontsova O., Singer B. B., Obrink B. Homophilic adhesion and CEACAM1-S regulate dimerization of CEACAM1-L and recruitment of SHP-2 and c-Src. *J Cell Biol*. 2009;187(4):569–81.

144. Молекули клітинної адгезії раково-ембріонального антигену (CEACAMs) [Текст]: монографія / М.С. Линдін, А.М. Романюк, В.В. Сікора, Б.Б. Зінгер; за заг. ред. А.М. Романюка. — Суми: СумДУ, 2020. — 219 с.