

## ВЫЯВЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННОГО ГЕТЕРООРГАННОГО АНТИГЕНА ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА В СОСТАВЕ НЕГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА

© Н. П. Терюкова,<sup>1</sup> П. А. Ивашкина, О. А. Миргородская, В. А. Иванов

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;  
<sup>1</sup> электронный адрес: iva@mail.cytspb.rssi.ru*

Методом электрофореза в полиакриламидном геле в составе негистоновых белков (НГБ) хроматина клеток асцитной гепатомы Зайдела, элюируемых с фосфоцеллюлозы 0.4—0.5 М NaCl, выявлен фосфопротеин с мол. массой порядка 42 кДа. Белок с такой же молекулярной массой присутствует в составе узких фракций НГБ хроматина почек и не обнаружен в печени крысы. Предполагается, что выявленный белок соответствует опухолеассоциированному гетероорганному НГБ-антигену, обнаруженному ранее в составе НГБ хроматина опухолевых клеток крыс. Методом MALDI масс-спектрометрии белок идентифицирован как киназа, регулируемая экстраклеточным сигналом, 2 (ERK2).

**Ключевые слова:** негистоновые белки хроматина, гепатоканцерогенез, гепатома, опухолеассоциированные антигены, митогенактивируемые протеинкиназы, масс-спектрометрия.

**Принятые сокращения:** НГБ — негистоновые белки, ТХУ — трихлоруксусная кислота; ПААГ — полиакриламидный гель, SDS — додецилсульфат натрия, ERK — киназа, регулируемая экстраклеточным сигналом, MAP-киназа — митогенактивируемая протеинкиназа.

Негистоновые белки (НГБ) хроматина представляют собой весьма гетерогенную по составу и функциям группу ядерных белков. Такие характеристики, как тканеспецифичность, значительная постсинтетическая модификационная изменчивость (ацетилирование, метилирование, фосфорилирование и др.), количественные и качественные изменения синтеза и фракционного состава НГБ в процессах пролиферации, эмбриогенеза, дифференцировки, опухолевой трансформации, указывают на важную роль этой группы белков в регуляции генной экспрессии (Гершун, 1980).

Ранее в составе НГБ хроматина клеток рабдомиосаркомы РА-235, гепатомы 27, асцитной гепатомы Зайдела, печени крыс после однократного воздействия гепатоканцерогенов 4-диметиламиноазобензола и N-нитрозодиаэтиламина, а также печени крыс после операции частичной гепатэктомии был выявлен опухолеассоциированный гетероорганнный антиген, т. е. антиген опухолевых клеток, присущий дефинитивным тканям, не гомологичным исследуемой опухоли, в данном случае — почке (Кушнер и др., 1983, 1986; Фель и др., 1984; Фель, 1990). При градиентной ионообменной хроматографии на фосфоцеллюлозе свободных от ДНК препаратов НГБ гетероорганнный антиген элюируется в узком интервале молярности NaCl (0.4—0.5 М) и обладает собственной протеинкиназной активностью, которую определяют в присутствии Mg<sup>2+</sup> по переносу фосфора с [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]-АТФ на белок (Kish, Kleinsmith, 1974). Из-за низкого содержания белка во фракциях, элюируемых в узком диапазоне концентраций NaCl (узкие фракции НГБ), иммунологиче-

ские и физико-химические исследования НГБ-антигена Кушнер с сотрудниками (1988) проводили радиометрическими методами. Так, по результатам гель-фильтрации и электрофореза мол. масса НГБ-антигена, меченного <sup>33</sup>P, составляет около 23 кДа.

Предполагается, что опухолеассоциированный гетероорганнный НГБ-антиген выступает в роли фактора, регулирующего генную экспрессию и задающего направление дисдифференцировки гепатоцитов в процессе неопластической трансформации (Фель, 1990). Так, в результате 5-часовой инкубации гепатоцитов крысы с узкими фракциями НГБ почек и клеток гепатомы Зайдела доля мелких гепатоцитов возрастает примерно на 12 % по сравнению с клетками, культивируемыми без НГБ. Вместе с тем наблюдаются экспрессия опухолеассоциированного мембранного гетероорганнного антигена на поверхности мелких гепатоцитов и фосфорилирование клеточных белков, тогда как без НГБ или при добавлении в среду инкубации узкой фракции НГБ интактной печени фосфорилирования белков гепатоцитов не наблюдается (Иванов и др., 1992; Терюкова и др., 2003). Таким образом, идентификация гетероорганнного НГБ-антигена может способствовать выяснению молекулярных механизмов злокачественной трансформации клетки.

Задачи исследования заключаются в выявлении опухолеассоциированного гетероорганнного НГБ-антигена в составе узких фракций НГБ хроматина клеток гепатомы Зайдела крысы методом электрофореза по Лэммли (Laemmli, 1970) и в идентификации опухолеассоциированного НГБ-антигена методом MALDI масс-спектрометрии.

## Материал и методика

В опытах использовали беспородных крыс-самцов массой 120—150 г (из питомника «Рапполово» РАМН). НГБ хроматина выделяли из почек по крайней мере 20 крыс, печени 5 крыс, клеток гепатомы Зайдела, осажденных из асцита 5—7 крыс, в соответствии с рекомендациями Кушнера и сотрудников (1984). Для этого из гомогената клеток перевиваемой гепатомы Зайдела, тканей почек и печени интактных крыс извлекали фракции чистых ядер, из которых экстрагировали как хромосомные НГБ, так и гистоны. Экстрагирующий раствор разбавляли до концентрации NaCl 0.35—0.40 М и осаждающиеся гистоны удаляли путем ультрацентрифугирования. Свободные от ДНК препараты НГБ получали последовательной обработкой супернатанта катионитом для удаления примесей основного характера и анионитом для удаления ДНК (Терюкова и др., 2003). Фракционирование НГБ хроматина осуществляли на колонках с фосфоцеллюлозой (Кушнер и др., 1984; Климова, Кушнер, 1992). Элюцию белка с колонки проводили при линейно нарастающей концентрации NaCl от 0.1 до 1.0 М. Из каждой фракции отбирали по 0.05 мл для рефрактометрического определения концентрации NaCl и по 0.2 мл из фракций, элюируемых 0.4—0.5 М NaCl, — для определения собственной протеинкиназной активности с помощью реакции переноса фосфора с  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  на белки. Для этого аликвоты по 0.2 мл помещали в раствор следующего состава: 0.01 мл 0.75 М  $\text{MgCl}_2$ , 0.08 мл 0.162 М Трис-HCl-буфера, pH 7.5, и 0.01 мл  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  (55—100 кБк). Пробы инкубировали 10 мин при 30 °С. Реакцию останавливали добавлением 2.7 мл 0.05 М ATP, белки осаждали в 5%-ной трихлоруксусной кислоте (ТХУ) и переносили на бумажные фильтры. Измеряли радиоактивность препаратов на сцинтилляционном счетчике фирмы Beckman.

Фракции, элюируемые с колонки 0.4—0.5 М NaCl, объединяли, белок осаждали ТХУ и разделяли методом электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 0.1 % додецилсульфата натрия (SDS) (Laemmli, 1970). Для определения молекулярной массы белков в качестве маркеров использовали бычий сывороточный альбумин (67 кДа), яичный альбумин (43 кДа) и иммуноглобулин G (тяжелая цепь — 50 кДа, легкая цепь — 25 кДа). По окончании электрофореза гель фиксировали в течение 20 мин раствором, содержащим 50 % этанола и 5 % уксусной кислоты, затем 10 мин отмывали 50%-ным этанолом и 30 мин дистиллированной водой. Белок окрашивали серебром в соответствии с рекомендациями Шевченко и сотрудников (Shevchenko et al., 1996). Для этого в течение 1 мин гель обрабатывали 0.02%-ным раствором тиосульфата натрия, затем дважды по 1 мин промывали дистиллированной водой и далее инкубировали 20 мин при 4 °С в 0.1%-ном растворе азотнокислого серебра. Гель дважды промывали по 1 мин дистиллированной водой и проявляли белковые полосы 0.04%-ным формалином в 2%-ном растворе карбоната натрия при интенсивном встряхивании. Для остановки реакции гель помещали в 5%-ную уксусную кислоту.

Компонент, обладающий собственной протеинкиназной активностью, узких фракций НГБ хроматина опухолевых клеток выявляли с помощью автордиографии. С этой целью узкие фракции НГБ гепатомы Зайдела (по 1 мл из фракции) метили  $^{33}\text{P}$ , как описано выше, и прово-

дили SDS -электрофорез с последующим электропереносом белка на нитроцеллюлозные мембраны (Millipore, США). Для визуализации белковых полос блот окрашивали Понсо С (0.2%-ный раствор в 3%-ной ТХУ) в течение 5 мин, отмечали положение маркеров, промывали дистиллированной водой, высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой Cronex 4 Medical X-Ray Film (Германия) при  $-70$  °С в течение 2 нед.

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре MALDI-TOF Bruker reflex IV в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Исследуемый белок с мол. массой порядка 42 кДа вырезали из ПААГ и обрабатывали согласно рекомендациям Шевченко и сотрудников (Shevchenko et al., 1996). Пробы в объеме 0.5 мкл наносили на мишень, добавляли 0.5 мкл матрицы — циано-4-гидроксикоричной кислоты в концентрации 20 мкг/мкл. Полученные пептидные спектры обрабатывали с использованием поисковой базы SWISSPROT.

## Результаты

Свободные от ДНК препараты НГБ хроматина крысы фракционировали методом ионообменной хроматографии на фосфоцеллюлозе и во фракциях, элюируемых в диапазоне концентраций NaCl примерно от 0.35 до 0.55 М, определяли собственную протеинкиназную активность. Как представлено на рис. 1, узкие фракции НГБ гепатомы Зайдела и почек, элюируемые 0.4—0.5 М NaCl, характеризуются увеличенной протеинкиназной активностью по отношению к соседним фракциям. В соответствующих фракциях НГБ печени пика радиоактивности не обнаружено, что, по-видимому, свидетельствует об отсутствии в их составе протеинкиназы.

Электрофоретическое исследование узких фракций НГБ выявило их гетерогенность по составу (рис. 2). Так, в образцах печени, гепатомы и почек крысы обнаружено по 2—3 полосы с мол. массой порядка 55—68 кДа, интенсивность которых в отдельных экспериментах значительная. В электрофоретических спектрах почки и гепатомы Зайдела присутствует также компонент с мол. мас-

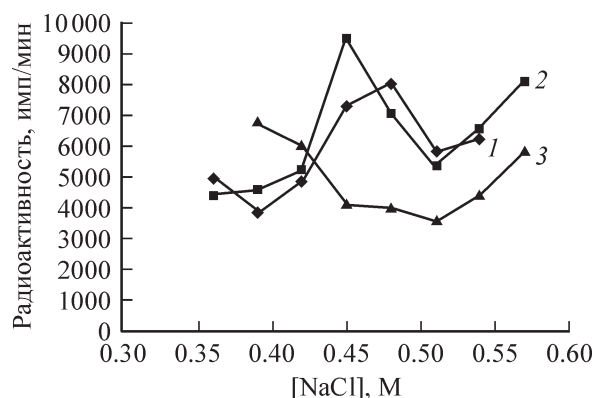


Рис. 1. Определение протеинкиназной активности узких фракций негистоновых белков хроматина почек (1), гепатомы Зайдела (2) и печени (3) крыс по фосфорилированию белка  $^{33}\text{P}$ .

Fig. 1. Detection of protein kinase activity of narrow non-histone protein (NHP) fractions in chromatin of rat kidney (1), Zajdela hepatoma (2), and liver cells (3), according to  $^{33}\text{P}$  protein phosphorylation.

сой около 42 кДа, который в аналогичных фракциях НГБ печени не обнаружен.

В то же время с помощью автордиографии показано (рис. 3), что в результате электрофореза НГБ, меченных путем переноса фосфора с  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  на белки в ходе проведения протеинкиназной реакции, в составе узких фракций НГБ опухолевых клеток удается выявить единственный профосфорилированный компонент с мол. массой около 42 кДа, тогда как фосфорилирования белков узких фракций НГБ печени не наблюдается (автордиограмма не представлена).

Таким образом, в составе НГБ хроматина клеток гепатомы Зайдела, элюируемых 0.4—0.5 М NaCl, присутствует белок с мол. массой порядка 42 кДа, который является фосфопротеином и, по-видимому, обладает собственной протеинкиназной активностью. Белок с такой же молекулярной массой обнаружен в составе узких фракций НГБ хроматина почек и отсутствует в печени. На наш взгляд, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что выявленный фосфопротеин соответствует обнаруженному ранее Кушнером с сотрудниками (1983) опухолеассоциированному гетероорганическому НГБ-антигену.

Результаты масс-спектрометрии НГБ с мол. массой порядка 42 кДа гепатомы Зайдела и почек крысы представлены в таблице.

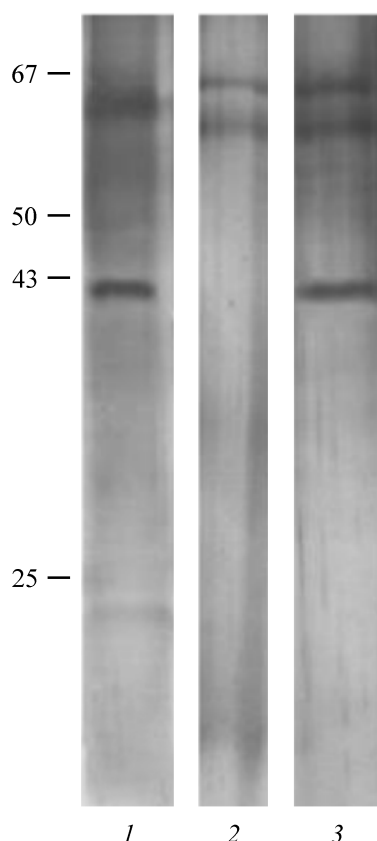


Рис. 2. SDS-электрофорез негистоновых белков хроматина почек (1), печени (2) и гепатомы Зайдела (3) крысы, элюируемых с фосфоцеллюлозы 0.4—0.5 М NaCl.

Числа слева — молекулярные массы маркерных белков, кДа.

Fig. 2. SDS-electrophoresis of rat kidney (1), Zajdela hepatoma (2), and liver (3) cell chromosomal NHP eluted with 0.4—0.5 М NaCl.

Left digits — molecular weight of marker proteins, kDa.

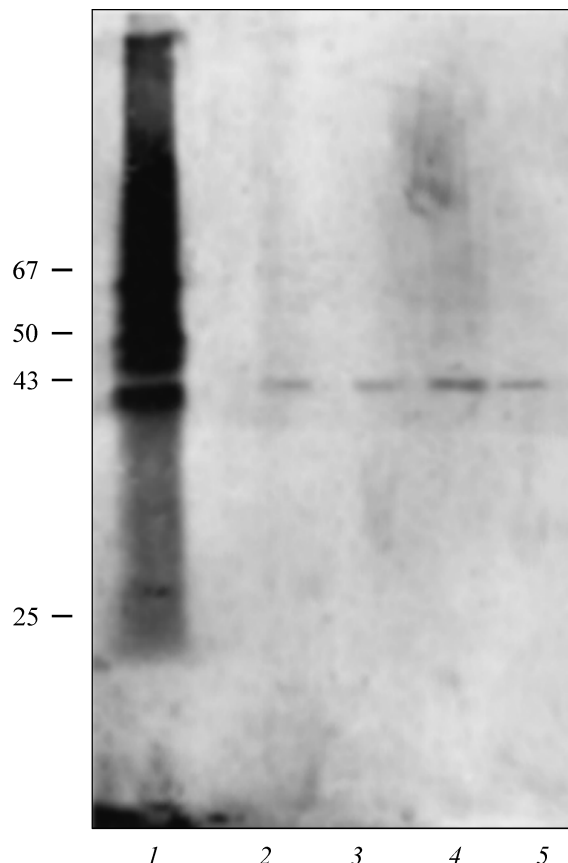


Рис. 3. Выявление компонента, меченного  $^{33}\text{P}$ , в составе узких фракций негистоновых белков (НГБ) и свободного от ДНК препарата НГБ хроматина гепатомы Зайдела (1) (автордиограмма).

В составе фракций НГБ, элюированных с фосфоцеллюлозы с помощью 0.395 (2), 0.415 (3), 0.435 (4) или 0.475 (5) М NaCl, обнаружен единственный фосфорилированный компонент с мол. массой около 42 кДа. Числа слева — молекулярные массы маркерных белков, кДа.

Fig. 3. Detection of a  $^{33}\text{P}$ -labeled component in narrow NHP fraction, and of DNA-free NHP preparation of Zajdela hepatoma chromatin (1) (autoradiogram).

The only phosphorylated component with molecular weight of 42 kDa is revealed in NHP fractions eluted with 0.395 (2), 0.415 (3), 0.435 (4) or 0.475 (5) М NaCl. Left digits — molecular weights of marker proteins, kDa.

Анализ спектров триптических пептидов показывает наличие пиков, связанных с загрязнением исследуемого белка кератином человека, что хорошо заметно при низком содержании белков в геле. Кроме того, часть пиков представлена пептидами, образовавшимися в результате

#### Идентификация белков с мол. массой около 42 кДа узких фракций НГБ гепатомы Зайдела и почек крысы методом масс-спектрометрии

Белок	Номер по базе SWISSPROT	Наименование белка	Молекулярная масса, кДа	Количество общих пептидов	Перекры- вающиеся последовательности, %
Гепатомы	P63086	ERK2	41 276	16	47
Почки				11	32

*a*

1	11	21	31	41	51	61	71
<u>MAAAAAAGPE</u>	<u>MVRGQVFDVG</u>	<u>PRYTNL SYIG</u>	<u>EGAYGMVCSA</u>	<u>YDNLNKVRVA</u>	<u>IKKISPFHQ</u>	<u>TYCQRTLREI</u>	<u>KILLRFRHEN</u>
81	91	101	111	121	131	141	151
<u>HGINDIIRA</u>	<u>PTIEOMKDVY</u>	<u>IVQDLMETDL</u>	<u>YKLLKTQHLS</u>	<u>NDHICYFLYQ</u>	<u>ILRGLKYYHS</u>	<u>ANVLHRDLKP</u>	<u>SNLLNTTCD</u>
161	171	181	191	201	211	221	231
<u>LKICDFGLAR</u>	<u>VADPDHDTG</u>	<u>FLTEYVATRW</u>	<u>YRAPEIMLNS</u>	<u>KGYTKSIDIW</u>	<u>SVGCI LAEML</u>	<u>SNRPIFGKH</u>	<u>YLDQLNHLG</u>
241	251	261	271	281	291	301	311
<u>ILGSPSQEDL</u>	<u>NCINLKARN</u>	<u>YLLSLPHKNK</u>	<u>VPWNRLFPNA</u>	<u>DSKALDLLDK</u>	<u>MLTFNPHKRI</u>	<u>EVEQALAHFY</u>	<u>LEQYYDPSDE</u>
321	331	341	351				
<u>PIAEAPFKFD</u>	<u>MELDDLPEK</u>	<u>LKELIFEETA</u>	<u>RFQPGYRS</u>				

*б*

1	11	21	31	41	51	61	71
<u>MAAAAAAGPE</u>	<u>MVRGQVFDVG</u>	<u>PRYTNL SYIG</u>	<u>EGAYGMVCSA</u>	<u>YDNLNKVRVA</u>	<u>IKKISPFHQ</u>	<u>TYCQRTLREI</u>	<u>KILLRFRHEN</u>
81	91	101	111	121	131	141	151
<u>HGINDIIRA</u>	<u>PTIEOMKDVY</u>	<u>IVQDLMETDL</u>	<u>YKLLKTQHLS</u>	<u>NDHICYFLYQ</u>	<u>ILRGLKYYHS</u>	<u>ANVLHRDLKP</u>	<u>SNLLNTTCD</u>
161	171	181	191	201	211	221	231
<u>LKICDFGLAR</u>	<u>VADPDHDTG</u>	<u>FLTEYVATRW</u>	<u>YRAPEIMLNS</u>	<u>KGYTKSIDIW</u>	<u>SVGCI LAEML</u>	<u>SNRPIFGKH</u>	<u>YLDQLNHLG</u>
241	251	261	271	281	291	301	311
<u>ILGSPSQEDL</u>	<u>NCINLKARN</u>	<u>YLLSLPHKNK</u>	<u>VPWNRLFPNA</u>	<u>DSKALDLLDK</u>	<u>MLTFNPHKRI</u>	<u>EVEQALAHFY</u>	<u>LEQYYDPSDE</u>
321	331	341	351				
<u>PIAEAPFKFD</u>	<u>MELDDLPEK</u>	<u>LKELIFEETA</u>	<u>RFQPGYRS</u>				

Рис. 4. Перекрытие по аминокислотной последовательности между ERK2/MAP-киназой крысы и триптическими пептидами белка с мол. массой около 42 кДа узких фракций негистоновых белков гепатомы Зайдела (*a*) и почек (*б*), выявленными методом MALDI масс-спектрометрии (перекрывающиеся пептиды *подчеркнуты*).

Fig. 4. The sequence overlap for rat ERK2/MAP-kinase and tryptic peptides of the protein with molecular weight 42 kDa of narrow NHP fraction of Zajdela hepatoma (*a*), and kidneys (*б*) identified by MALDI mass spectrometry (the overlapped peptides *are underlined*).

неспецифического разрыва белков. При анализе спектров и в работе с базой данных мы руководствовались имеющимися в литературе рекомендациями (Jensen et al., 1998; Baldwin, 2004). Так, для положительной идентификации белка необходимо совпадение по моноизотопной массе по крайней мере 5 триптических пептидов при отклонении измеренных результатов от рассчитанных значений (при толерантности) не более 0.1 Да. При значениях толерантности 1—2 Да требуется более 10 совпадений для успешного поиска белка. Кроме того, 6 совпадений по моноизотопной массе при 20%-ном перекрытии по аминокислотной последовательности может быть достаточно для идентификации белка. В результате анализа спектра белка, выделенного из НГБ хроматина клеток гепатомы Зайдела, при толерантности 0.1 Да мы обнаружили 16 общих пептидов и 47 % перекрытия (см. таблицу; рис. 4, *a*), и это позволяет достаточно уверенно утверждать, что опухолеассоциированный гетероорганный НГБ-антиген представляет собой ERK2/митогенактивируемую протеинкиназу (MAP-киназу). Для белка, выделенного из НГБ хроматина почки, при толерантности 0.2 выявили 11 совпадений по моноизотопной массе и 32 % перекрытия по аминокислотной последовательности с ERK2 (рис. 4, *б*). Как видно на рисунках, при заданных условиях поиска оба белка перекрываются с ERK/MAP-киназой по аминокислотам 53—65, 78—112 и 271—283.

### Обсуждение

Результаты, полученные нами при фракционировании свободных от ДНК препаратов НГБ на фосфоцеллюлозе, подтверждают данные Кушнера с сотрудниками (1983), которые впервые выявили в узких фракциях НГБ гепатомы Зайдела и почек крысы пики собственной про-

теинкиназной активности, тогда как в аналогичных фракциях печени такой активности не наблюдалось. Дальнейшее изучение физико-химических характеристик гетероорганного НГБ-антигена и его идентификация затруднены низким содержанием белка во фракциях. Поэтому мы использовали весь белок узких фракций, полученный в результате его препаративного выделения, для электрофоретического выявления НГБ. После окончания электрофореза гель окрашивали серебром по методу, рекомендуемому для последующего исследования белка с помощью масс-спектрометрии (Shevchenko et al., 1996). Несомненные достоинства этого метода — его высокая чувствительность, отсутствие фонового окрашивания и быстрота. Нами обнаружена гетерогенность всех трех образцов НГБ по составу, однако только в узких фракциях НГБ опухолевых клеток и почек присутствует белок с мол. массой около 42 кДа, отсутствующий в печени. Учитывая чувствительность метода окрашивания серебром, можно считать, что содержание этих белков не превышает 0.5 пмоль.

В то же время для выявления компонента, обладающего протеинкиназной активностью, проводили электрофорез узких фракций НГБ гепатомы и печени, меченных <sup>33</sup>P. Как оказалось, единственный <sup>33</sup>P-фосфопротеин узких фракций НГБ опухолевых клеток, фосфорилирование которого произошло путем переноса фосфора с [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]-АТФ в результате проведения протеинкиназной реакции, имеет мол. массу порядка 42 кДа и отсутствует в печени. Гетерогенность фракций по составу, по-видимому, не позволяет однозначно утверждать, что выявленный белок является самофосфорилирующейся протеинкиназой. Однако отсутствие протеинкиназной активности в печени, в узких фракциях которой также выявлены белки в области 55—68 кДа, позволяет предполагать наличие собственной протеинкиназной активности у фосфопротеина с мол. массой 42 кДа.

Полученные нами данные отличаются от результатов Кушнера с сотрудниками (1988а, 1988б), которые проводили иммунологические и физико-химические исследования НГБ-антигена с помощью радиометрических методов. На наш взгляд, методические подходы, которые использовались при проведении гель-фильтрации и SDS-электрофореза, могли приводить к деструкции белка и не позволяют по распределению радиоактивности в образцах судить о качественном и количественном составе фракций НГБ. Так, для проведения гель-фильтрации фракции НГБ, элюируемые с фосфоцеллюлозы 0.4 и 0.47 М NaCl, фосфорилировали и после 2-суточного диализа наносили на колонку с сефадексом. В другом варианте опытов фракционировали фосфорилированные белки, экстрагированные с фильтров, на которых они были осаждены ТХУ, для подсчета радиоактивности в пробах. По кривой распределения радиоактивности в хроматографических фракциях основной компонент узких фракций НГБ имел мол. массу порядка 23 кДа, тогда как минорные компоненты — около 55—75 кДа. При электрофоретическом исследовании узких фракций НГБ, меченых  $^{33}\text{P}$ , гель после фиксации разрезали вдоль дорожек на поперечные кусочки, которые подсушивали, и подсчитали их радиоактивность. Наибольшей радиоактивностью (220 и 114 имп/мин) обладали кусочки геля, соответствующие белкам с мол. массами 20 и 26 кДа соответственно. Полоска из зоны 40 кДа имела активность 105 имп/мин, а из зоны 67 кДа — 58 имп/мин при среднем фоне 53 имп/мин.

По нашим наблюдениям, исследуемый белок обладает высокой лабильностью, и, возможно, происходит его разрушение в ходе работы, так как хранение и замораживание образцов приводят к появлению пятна в области 20—25 кДа как при окрашивании полиакриламидного геля серебром, так и по результатам автордиографии.

Таким образом, на наш взгляд, белок с мол. массой порядка 42 кДа узких фракций НГБ асцитной гепатомы Зайдела и почек крысы соответствует опухолеассоциированному гетероорганному НГБ-антигену. Результаты идентификации белков по триптическим пептидам методом масс-спектрометрии позволяют с высокой долей вероятности считать, что выявленный более 20 лет назад опухолеассоциированный гетероорганнный антиген представляет собой ERK2/MAP-киназу.

В последнее десятилетие значительно расширились представления о структуре, свойствах и биологической роли протеинкиназ (Гусев, 2000), уровнях их экспрессии и активности в тканях различных органов в норме и при патологии. В большинстве своем протеинкиназы являются минорными клеточными белками, и их идентификация возможна только с помощью молекулярно-биологических методов, чем, по-видимому, объясняются трудности с выделением и идентификацией гетероорганного НГБ-антигена. Представители ERK /MAP-киназного семейства относятся к Ser/Thr- и Tyr-протеинкиназам, т. е. переносят  $\gamma$ -фосфатный остаток АТФ (или ГТФ) на спиртовые группы соответственно серина и треонина или тирозина. Активация ERK/MAP-киназ практически всегда связана с пролиферацией и дифференцировкой клетки. Так, в ответ на воздействие факторов роста, гормонов или цитокинов в клетке запускаются системы передачи и усиления этих сигналов, работающие по каскадному типу активации (фосфорилирования) определенных белков в определенной последовательности (Потехина, Надеждина, 2002). Кроме того, в литературе появляется все

больше доказательств участия внеклеточного матрикса в регуляции активности ERK/MAP-киназного пути посредством интегриновых рецепторов (Chen et al., 1996; Guan, 1997) и, в частности, участия ламинина через интегрин  $\alpha 6 \beta 1$  (Ferletta et al., 2003). Функционирует ERK/MAP-киназный каскад следующим образом: митогенный сигнал с клеточной поверхности поступает через киназу киназы MAP-киназы на киназу MAP-киназы (MEK 1/2), которая в цитоплазме покоящихся клеток находится в комплексе с нефосфорилированной формой ERK/MAP-киназы (Adachi et al., 2000). В ответ на митогенный стимул MEK фосфорилирует ERK1/2, что приводит к диссоциации комплекса. Часть активированной формы ERK1/2 транслоцируется в ядро, где фосфорилирует и активирует транскрипционные факторы, инициируя процесс пролиферации. В то же время происходит массивное перемещение MEK из цитоплазмы в ядро (Jara et al., 1997; Yao et al., 2001), что, по-видимому, объясняется участием MEK в экспорте ERK1/2 из ядра обратно в цитоплазму. Таким образом, в покоящихся клетках ERK1/2 и MEK локализованы в цитоплазме, а активация MAP-киназного каскада приводит к ядерной локализации этих протеинкиназ.

У крыс активация ERK/MAP-киназного семейства обнаружена в период эмбриогенеза в различных участках развивающейся почки (Omori et al., 2000). В то же время показано (Terada et al., 1995), что мРНК и белки MEK-киназа, Raf-1-киназа, MEK и ERK/MAP-киназа повсеместно экспрессируются в каждом сегменте нефрона интактной почки крысы. По мнению авторов, MAP-киназные каскады играют важную роль в регуляции почечной функции.

В экспериментах *in vivo* после операции частичной гепатэктомии у крыс и *in vitro* после стимуляции клеток эпидермальным фактором роста выявлена существенная роль компонентов ERK/MAP-киназного сигнального пути в регуляции прогрессии пролиферирующих гепатоцитов в фазе  $G_1$  клеточного цикла (Talarmin et al., 1999; Goutant et al., 2002). Так, например, активация MEK2/ERK2 в ранней фазе  $G_1$  приводит к изменению формы клетки, ее расплыванию. Именно зависимое от MAP-киназы расплывание клетки необходимо для осуществления перехода  $G_1/S$  и репликации ДНК. Ингибирование интегрин  $\beta 1$  приводит к остановке клеток в фазе  $G_1$  клеточного цикла (Rescan et al., 2001).

В экспериментах на трансгенных мышках показано, что при индукции опухолей онкогенами активируются различные пути передачи внутриклеточного сигнала и увеличивается активность разных протеинкиназ (Amundadottir, Leder, 1998). Конститутивная активация MAP-киназы обнаружена в 36.2 % клеточных линий опухолей человека (Hoshino et al., 1999) и в 58 % случаев гепатокарциномы человека (Ito et al., 1998). Значительное увеличение экспрессии и активности ERK1/2 и MEK1/2 наблюдается при гепатоцеллюлярной карциноме человека (Schmidt et al., 1997; Zhu et al., 2002). Важно подчеркнуть, что при проведении иммуногистохимического исследования с использованием антител против фосфорилированных форм ERK1/2 и MEK1/2 интенсивное окрашивание обнаружено только в ядрах опухолевых клеток, тогда как ядра соседних нормальных гепатоцитов не окрашивались (Huynh et al., 2003). Следовательно, в клетках опухолей гепатоцеллюлярного происхождения выявлено не только увеличение экспрессии этих компонентов ERK/MAP-киназного каскада, но и показана их

ядерная локализация. Предполагается, что активация MAP-киназ обусловлена изменением активностей Raf-1, Ras и других сигнальных молекул каскада. Так, обнаружен высокий уровень экспрессии активированной формы протоонкогена Raf-1, одной из MEK-киназ (Hwang et al., 2004).

Установлено, что конститутивная активация MEK приводит к трансформации клеток млекопитающих (Mansour et al., 1994). В результате экспрессии мутантной формы MEK, активность которой в 400 раз превышает нормальный уровень, клетки формировали трансформированные локусы, эффективно росли в жидком агаре и обладали высокой туморогенностью. В экспериментах на крысах *in vivo* показано увеличение ERK1/2 и MEK1 в клетках гепатоцеллюлярной карциномы в 3—4 раза по сравнению с соседними нормальными участками печени (McKillop et al., 1997). Экспрессия ERK1/2 увеличена в 4.5—7.5 раза в образцах гепатоцеллюлярной карциномы, индуцированной гепатоканцерогеном 3-метил-4-диметиламино-азобензеном у крыс (Toyoda et al., 1999).

Таким образом, литературные данные относительно роли ERK2/MAP-киназы в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки и неопластической трансформации хорошо согласуются с представлениями Феля (1990), который постулировал, что исследуемый опухолеассоциированный гетероорганный НГБ-антиген выступает в качестве фактора, регулирующего генную экспрессию и задающего направление дисдифференцировки гепатоцитов в процессе неопластической трансформации.

Авторы выражают благодарность сотруднику Отдела протеомных исследований Научно-исследовательского института биомедицинской химии РАМН (Москва) М. В. Серебряковой за помощь в проведении масс-спектрометрии белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49186).

### Список литературы

- Гершун В. А. 1980. Негистоновые белки хроматина нормальных и опухолевых клеток. Цитология. 22 (8) : 875—889.
- Гусев Н. Б. 2000. Протеинкиназы: строение, классификация, свойства и биологическая роль. Сорос. образоват. журн. 6 (12) : 4—12.
- Иванов В. А., Федоров Л. Ю., Грандильевская А. Б., Климова А. А., Кушнер В. П., Фель В. Я. 1992. Экспрессия гетероорганного антигена почечной природы на поверхности культивируемых гепатоцитов крыс под влиянием узких фракций хромосомальных негистоновых белков. Цитология. 34 (1) : 80—83.
- Климова А. А., Кушнер В. П. 1992. Фракционирование хромосомных негистоновых белков почек и печени крыс и их комплексов с ДНК с использованием катионитов фосфоцеллюлозы и SE-сефадекса. Цитология. 34 (7) : 70—75.
- Кушнер В. П., Гершун В. А., Горячева А. А. 1984. О выделении негистоновых белков из хроматина клеток животных. Цитология. 26 (10) : 1196—1199.
- Кушнер В. П., Гершун В. А., Подгаецкая Д. Я., Фель В. Я. 1983. Исследование собственной фосфопротеинкиназной активности и антигенных свойств свободных от ДНК негистоновых белков клеток почек, печени интактных крыс и асцитной гепатомы Зайдела. Эксперим. онкол. 5 (5) : 23—27.
- Кушнер В. П., Грандильевская А. Б., Иванов В. А. 1988а. Молекулярные массы ассоциированных с гепатомами крыс гетероорганного НГБ-антигена почечной природы. Цитология. 30 (10) : 1226—1231.
- Кушнер В. П., Грандильевская А. Б., Иванов В. А., Фель В. Я. 1988б. Радиометрическое выявление не визуализируемых иммунопреципитатов, образуемых ассоциированными с гепатомами гетероорганного антигенами почечной природы <sup>33</sup>P-фосфорилированных фракций негистоновых белков хроматина. Цитология. 30 (1) : 53—57.
- Кушнер В. П., Иванов В. А., Фель В. Я. 1986. Гетероорганного антигена почечной природы в составе ядерных негистоновых белков регенерирующей печени крыс. Цитология. 28 (1) : 96—101.
- Потехина Е. С., Надеждина Е. С. 2002. Митоген-активируемые протеинкиназные каскады и участие в них Ste20-подобных протеинкиназ. В кн.: Успехи биологической химии. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН. 42 : 235—256.
- Терюкова Н. П., Грандильевская А. Б., Розанов Ю. М., Иванов В. А. 2003. Влияние узких фракций негистоновых белков хроматина на экспрессию мембранного опухолеассоциированного антигена МА-50 и фосфорилирование белков культивируемых гепатоцитов крысы. Цитология. 45 (3) : 277—283.
- Фель В. Я. 1990. Антигенная дивергенция опухолевых клеток, обусловленная экспрессией гетероорганного антигена, как проявление дисдифференцировки при канцерогенезе. Цитология. 32 (5) : 407—421.
- Фель В. Я., Кушнер В. П., Иванов В. А., Трошин А. С. 1984. Ядерные негистоновые белки гепатом и печени крыс после действия гепатоканцерогенов и операции частичной гепатэктомии. ДАН СССР. 279 (4) : 1008—1011.
- Adachi M., Fukuda M., Nishida E. 2000. Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. J. Cell Biol. 148 : 849—856.
- Amundadottir L. T., Leder P. 1998. Signal transduction pathways activated and required for mammary carcinogenesis in response to specific oncogenes. Oncogene. 16 : 737—746.
- Baldwin M. A. 2003. Protein identification by mass spectrometry. Mol. Cell. Proteomics. 3 : 1—9.
- Chen Q., Lin T. H., Der C. J., Juliano R. L. 1996. Integrin-mediated activation of MEK and mitogen-activated protein kinase is independent of Ras. J. Biol. Chem. 271 : 1822—1827.
- Coutant A., Rescan C., Gilot D., Loyer P., Guguen-Guillouzo C., Baffet G. 2002. PI3K-FRAT/mTOF pathway is critical for hepatocyte proliferation whereas MEK/ERK supports both proliferation and survival. Hepatology. 36 : 1079—1088.
- Ferletta M., Kikkawa Y., Yu H., Talts J. F., Durbeej M., Sonnenberg A. T., Timpl R., Campbell K. P., Ekblom P., Genesher E. 2003. Opposing roles of integrin alpha6beta1 and dystroglycan in laminin-mediated extracellular signal-regulated kinase activation. Mol. Biol. Cell. 14 : 2088—2103.
- Guan J. L. 1997. Role of focal adhesion kinase in integrin signaling. Int. J. Biochem. Cell Biol. 29 : 1085—1096.
- Hoshino R., Chatani Y., Yamori T., Tsuruo T., Oka H., Yoshida O., Shimada Y., Ari-i S., Wada H., Fujimoto J., Kohno M. 1999. Constitutive activation of the 41/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. Oncogene. 18 : 813—822.
- Huynh H., Nguyen T. T. T., Chow K.-H. P., Tan P. H., Soo K. C., Tran E. 2003. Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. BMC Gastroenterology. 3 : 19.
- Hwang Y. H., Choi J. Y., Kim S. D., Chung E. S., Kim T., Koh S. S., Lee B., Bae S. H., Kim J., Park Y. M. 2004. Over-expression of c-raf-1 proto-oncogene in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Hepatol. Res. 29 : 113—121.
- Ito Y., Horimoto M., Wada S., Tanaka Y., Kasahara A., Ueki T., Hirano T., Yamamoto H., Fujimoto J., Okamoto E., Hayashi N., Hori M. 1998. Activation of mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase in human hepatocellular carcinoma. Hepatology. 27 : 951—958.

- Jaaro H., Rubinfeld H., Hanoch T., Seger R. 1997. Nuclear translocation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK 1) in response to mitogenic stimulation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94 : 3742—3747.
- Jensen O. N., Larsen M. R., Roepstorff P. 1998. Mass spectrometric identification and microcharacterization of proteins from electrophoretic gels: strategies and applications. *Proteins. Suppl.* 2 : 74—89.
- Kish V. M., Kleinsmith L. J. 1974. Nuclear protein kinase. Evidence for their heterogeneity, tissue specificity, substrate specificities, and differential responses to cyclic adenosine 3' : 5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.* 249 : 750—760.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680—685.
- Mansour S. J., Matten W. T., Hermann A. S., Candia J. M., Rong S., Fukasawa K., Vande Woude G. F., Ahn N. G. 1994. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science.* 265 : 966—970.
- McKillop I. H., Schmidt C. M., Cahill P. A., Sitzmann J. V. 1997. Altered expression of mitogen-activated protein kinases in rat model of experimental hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 26 : 1484—1491.
- Omori S., Hida M., Ishikura K., Kuramochi S., Awazu M. 2000. Expression of mitogen-activated protein kinase family in rat renal development. *Kidney Int.* 58 : 27—37.
- Rescan C., Coutant A., Talarmin H., Theret N., Glaise D., Gu-guen-Guillouzo C., Baffet G. 2001. Mechanism in the sequential control of cell morphology and S phase entry by epidermal growth factor involves distinct MEK/ERK activations. *Mol. Biol. Cell.* 12 : 725—738.
- Schmidt C. M., McKillop I. H., Cahill P. A., Sitzmann J. V. 1997. Increased MAP expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236 : 54—58.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68 : 850—858.
- Talarmin H., Rescan C., Cario S., Glaise D., Zanninelli G., Bilo-deau M., Loyer P., Guguen-Guillouzo C., Baffet G. 1999. The mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signaling pathway involved in the regulation of G<sub>1</sub> phase progression in proliferating hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 6003—6011.
- Terada Y., Yamada T., Takayama M., Nonogushi H., Sasaki S., Tomita K., Maruma F. 1995. Presence and regulation of Raf-1-K (Kinase), MAPK-K, MAP-K, and S6-K in rat nephron segments. *J. Amer. Soc. Nephrol.* 6 : 1565—1577.
- Toyoda M., Hashimoto N., Tokita K., Goldstein B. J., Yokosuka O., Kanatsuka A., Suzuki Y., Saito Y. 1999. Increased activity and expression of MAP kinase in HCC model rats induced by 3'-methyl-4-dimethylammonio-azobenzene. *J. Hepatol.* 31 : 725—733.
- Yao Z., Flash I., Raviv Z., Yung Y., Asscher Y., Pleban S., Seger R. 2001. Non-regulated and stimulated mechanisms cooperate in the nuclear accumulation of MEK 1. *Oncogene.* 20 : 7588—7596.
- Zhu J., Leng X., Dong N., Liu Y., Li G., Du R. 2002. Expression of mitogen-activated protein kinase and its upstream regulated signal in human hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 40 : 1—16. (Китай).

Поступила 31 V 2005

DETECTION AND IDENTIFICATION OF A TUMOR-ASSOCIATED HETEROORGANIC ANTIGEN OF ZAJDELA HEPATOMA IN NON-HISTONE PROTEINS OF CHROMATIN

N. P. Teryukova,<sup>1</sup> P. A. Ivashkina, O. A. Mirgorodskaya, V. A. Ivanov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

<sup>1</sup> e-mail: iva@mail.cytspb.tssi.ru

By polyacrylamide gel electrophoresis, a phosphoprotein with mol. weight of 42 kDa was detected in non-histone proteins (NHP) of chromatin of Zajdela ascitic hepatoma cells eluted from phosphocellulose with 0.4—0.5 M NaCl. A protein of the same mol. weight is present in narrow fractions of rat kidney chromatin, but is absent in rat liver. It is suggested that the revealed protein corresponds to the tumor-associated heteroorganic NHP antigen detected earlier in NHP chromatin of rat tumor cells. By MALDI mass spectrometry, this phosphoprotein was identified as ERK2/mitogen-activated protein kinase.