

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛАМИНИНА С КОМПОНЕНТАМИ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК АСЦИТНОЙ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА

© И. И. Тюреева,<sup>1,\*</sup> О. А. Миргородская,<sup>1</sup> О. А. Черепанова,<sup>1</sup> Е. П. Подольская,<sup>2</sup>  
М. В. Серебрякова,<sup>3</sup> В. А. Иванов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, <sup>2</sup> Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург,  
и <sup>3</sup> Институт биомедицинской химии им. Ореховича РАМН, Москва;  
\* электронный адрес: [tii@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:tii@mail.cytspb.rssi.ru)

Методом аффинной хроматографии на ламинин-сефарозе из плазматических мембран клеток гепатомы Зайдела выделено несколько компонентов, связывающихся с ламинином. Их мол. массы составили около 80, 67, 60, 55, 52, 48 и 43 кДа. При выделении интегриновых рецепторов к ламинину из плазматических мембран клеток гепатомы в присутствии  $MnCl_2$  обнаружено, что в этих условиях при элюции белков с колонки ЭДТА выявляется лишь один основной компонент с мол. массой около 80 кДа. Белок с мол. массой около 80 кДа был идентифицирован методом масс-спектрометрии как GRP78 (78 kDa glucose-regulated protein precursor), принадлежащий к семейству белков теплового шока 70 кДа, который, как показано в последние годы рядом исследований, может быть локализован на поверхности клеток, в том числе гепатоцитов.

Ключевые слова: гепатома, ламинин, рецепторы ламинина, белки теплового шока, GRP78.

Ламинины — это растущее семейство гетеротримерных гликопротеинов внеклеточного матрикса (ВКМ), обнаруживаемых в составе базальных мембран (БМ) в тесном взаимодействии с поверхностью клеток. Ламинин играет значительную роль в пролиферации гепатоцитов, становлении архитектуры печени и ее васкуляризации. Отличительной особенностью ВКМ в здоровой печени является отсутствие базальной мембраны в пространстве Диссе — между балками гепатоцитов и синусоидами, которая не может быть сформирована из-за отсутствия ламинина и нидогена или их слишком незначительных количеств (Martinez-Hernandez, Amenta, 1993, 1995). Отсутствие БМ в пространстве Диссе является функционально оправданным необходимостью в быстром двухнаправленном обмене макромолекул между плазмой и гепатоцитами. В нормальной взрослой печени ламинин находят в основном в базальных мембранах крупных кровеносных сосудов в регионе портальной и центральной вен и в базальной мембране желчных протоков (Sell, Ruoslahti, 1982; Clement et al., 1988; Wewer et al., 1992; Matsumoto et al., 1999). Однако при пролиферативных процессах в печени — в период эмбрионального и раннего постэмбрионального развития органа (Wewer et al., 1992; Martinez-Hernandez, Amenta, 1995; Amenta, Harrison, 1997), в результате воздействия токсических веществ, после частичной гепатэктомии и ряде патологических состояний — в пространстве Диссе обнаруживается ламинин (Kato et al., 1992; Martinez-Hernandez, Amenta, 1995; Matsumoto et al., 1999). Важность этого события подчеркивает тот факт, что, например после частичной гепатэктомии, синтез ламинина выявляется уже спустя 6 ч после операции, и это предшествует активации

синтеза ДНК гепатоцитов, регистрируемого лишь спустя 16 ч. Через 24 ч после операции наблюдается максимум синтеза ламинина, совпадающий с максимумом синтеза ДНК (Kato et al., 1992). Канцерогенез в печени также ассоциирован с синтезом ламинина, который обнаруживали как в пренеопластических узелках, так и в уже сформировавшихся гепатоцеллюлярных опухолях (Albrechtsen et al., 1988; Rescan et al., 1990, 1991; Yoshida et al., 1996; Giannelli et al., 2003). Таким образом, по-видимому, обеспечивается микроокружение, необходимое клеткам для пролиферации и, возможно, выполнения других функций, связанных с их жизнедеятельностью; при этом повышается также и аффинность клеток к ламинину (Carlsson et al., 1981; Kato et al., 1992; Anilkumar, Sudhakaran, 1993).

Клетки взаимодействуют с ламинином через специфические интегриновые и неинтегриновые рецепторы, расположенные на клеточной поверхности. В соответствии с синтезом ламинина происходит их количественное и качественное изменение. Так, было показано, например, что уровень мРНК неинтегринового рецептора ламинина с мол. массой 67 кДа (67 РЛ) существенно повышен в фетальных гепатоцитах крыс, в узелковых новообразованиях печени крыс, получивших гепатоканцероген (Rescan et al., 1990), и в 10 раз выше в культивируемых клетках гепатом, чем в нормальных гепатоцитах (Rescan et al., 1991). Кроме того, канцерогенез в печени связан со сверхэкспрессией рецептора ламинина и коллагена — интегрин  $\alpha\beta 1$  и синтезом de novo рецептора ламинина — интегрин  $\alpha\beta 1$  (Nejjari et al., 1999). В целом, однако, немного известно о мембранных белках гепатоцитов, связывающих ламинин (рецепторах ламинина), и их

роли как в регенеративно-пролиферативных процессах, так и при канцерогенезе.

Ранее нами было показано, что клетки асцитной гепатомы Зайдела крысы характеризуются наличием на их поверхности ламинина, который был изначально обнаружен с помощью антипочечной органоспецифической иммуносыворотки при изучении антигенов, синтез которых ассоциирован с гепатоцеллюлярными опухолями, но являющихся нормальными для тканей другого гистогенеза (гетероорганные антигены). Задачей настоящего исследования стало определение потенциальных белков плазматических мембран клеток гепатомы Зайдела, посредством которых осуществляется взаимодействие клеток с эндогенным ламинином, и выяснение их принадлежности к гетероорганическим антигенам (антигенам почки крысы). Для решения поставленной задачи были использованы метод аффинной хроматографии на колонке с ламинин-сефарозой и метод масс-спектрометрии.

### Материал и методика

Исследования проводили на белых беспородных взрослых крысах-самцах массой 150 г (питомник «Рапполово» РАМН). Асцитную гепатому Зайдела перевивали крысам путем внутрибрюшинной инъекции 0.5 мл асцита, материал получали через 5—6 сут. Опухолевые клетки отмывали от асцитической жидкости 0.15 М NaCl.

Плазматические мембраны клеток гепатомы Зайдела и гепатоцитов получали по известному методу (Naeffner et al., 1980), а препараты клеточных мембран почки («клеточные тени») были приготовлены в соответствии с рекомендациями Белошапкиной и Абелева (Beloshapkina, Abelev, 1965) путем ряда экстракций с увеличивающейся концентрацией NaCl и сменной pH. Концентрация белка клеточных мембран определяли по методу Марквелла и соавторов (Markwell et al., 1978).

Иммуносыворотку получали путем иммунизации кроликов препаратами клеточных мембран почки крысы с адьювантом Фройнда с последующим истощением ее гомогенатом печени крысы и выделением фракции иммуноглобулинов G методом аффинной хроматографии на колонке белок А—агароза (Терюкова, Иванов, 1993). В качестве контроля таким же образом была очищена фракция IgG из нормальной сыворотки интактного кролика. В дальнейшем полученные препараты антител будем называть иммуносывороткой (для обозначения антипочечной сыворотки) и нормальной сывороткой кролика. Специфичность антипочечной иммуносыворотки оценивали методом твердофазного иммуоферментного анализа с помощью фотометра с вертикальным лучом (Titertek Multiscan, Финляндия) при длине волны 492 нм (Терюкова, Иванов, 1993). Указанная иммуносыворотка после истощения гомогенатом печени крысы проявляла высокую специфичность в отношении клеточных мембран почки крысы, но практически не взаимодействовала с плазматическими мембранами гепатоцитов (фоновое взаимодействие, равное уровню взаимодействия мембран с сывороткой интактного кролика). При этом наличие реакции с плазматическими мембранами клеток гепатомы Зайдела даже на больших разведениях иммуносыворотки позволило сделать вывод о присутствии антигенов, свойственных нормальным почкам крысы (Тюряева и др., 2005).

Для приготовления аффинной колонки 1.7 г CNBr-сефарозы (Sigma, США), предварительно выдержанной в течение 15 мин в 1 М HCl и промытой 0.1 М NaHCO<sub>3</sub> с 0.5 М NaCl, pH 8.3, соединяли с 2.1 мг ламинина-1, находящегося в том же буферном растворе, который использовали для промывания сефарозы. Инкубацию ламинина с CNBr-сефарозой проводили в течение ночи при 4 °C, блокирование оставшихся активных центров сорбента осуществляли 0.2 М глицином, pH 8, при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем сорбент отмывали попеременно 0.1 М ацетатным буферным раствором с 0.5 М NaCl, pH 4, и 0.1 М NaHCO<sub>3</sub> с 0.5 М NaCl, pH 8.3.

Белки плазматических мембран клеток гепатомы и гепатоцитов лизировали на льду в растворе, содержащем 25 мМ Трис-HCl, pH 7.4 и 1%-ный Тритон X-100 с добавлением протеаз — 50 мкг/мл фенолметилсульфонил фторида и 50 мкг/мл N-этилмалеамида, в течение 30 мин. Нерастворившийся материал осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин. Избыток детергента удаляли инкубацией раствора мембранных белков с адсорбентом SM-2 Biobeads (BioRad, США), которую проводили в течение 5 мин на льду, затем SM-2 Biobeads удаляли с помощью низкоскоростного центрифугирования. Связывание мембранных белков с ламинин-сефарозой проводили в объеме (batch method) в течение ночи при 4 °C. После этого смесь переносили в колонку и промывали 25 мМ Трис-HCl с 0.1%-ным Тритоном X-100, pH 7.4. Связавшиеся с ламинином белки элюировали 0.1 М глицином, pH 2.4, с немедленной нейтрализацией фракции 0.5 М NaOH.

Для выделения интегриновых рецепторов мембраны опухолевых клеток лизировали в растворе, содержащем 0.15 М NaCl, 1 мМ MnCl<sub>2</sub> и 1%-ный Тритон X-100 в 10 мМ Трис-HCl, pH 7.4, с добавлением ингибиторов протеаз, указанных выше. Связывание мембранных белков с ламинином проводили в течение 1 ч, затем колонку отмывали от несвязавшегося материала 0.15 М NaCl, 1 мМ MnCl<sub>2</sub> и 0.1%-ным Тритоном X-100 в 10 мМ Трис-HCl, pH 7.4. Элюировали белки с колонки 10 мМ Трис-HCl-буферным раствором, содержащим 0.15 М NaCl, 0.1%-ный Тритон X-100 и 20 мМ ЭДТА, а затем 0.1 М глицином, pH 2.4.

Электрофоретическое разделение восстановленных белков проводили в 5%-ном полиакриламидном геле (Laemmli, 1970) с использованием маркеров молекулярной массы (Sigma, США). После окончания электрофореза белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0.45 мкм (Amersham, Швеция) в течение 2 ч при напряжении 100—300 В и силе тока 500 мА. Для визуализации белковых полос нитроцеллюлозную мембрану окрашивали Понсо С. Затем нитроцеллюлозную мембрану блокировали 3%-ным раствором обезжиренного молока на 20 мМ Трис-HCl-буферном растворе с 0.15 М NaCl, pH 7.4 (TBS), в течение 1.5 ч при 20 °C и инкубировали в течение 18 ч при 4 °C с антипочечной иммуносывороткой, разведенной TBS с 1%-ным обезжиренным молоком 1 : 200. В качестве вторых антител использовали козы антигела против кроличьих IgG, конъюгированные с щелочной фосфатазой (Sigma, США), разведенные в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Белки, разделенные в полиакриламидном геле, визуализировали окрашиванием Кумасси R-250, вырезали из геля и подготавливали для масс-спектрометрического

анализа (Shevchenko et al., 1996). Анализ проводили на масс-спектрометре MALDI TOF Bruker reflex IV в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Пробы в объеме 0.5 мкл наносили на мишень, затем добавляли 0.5 мкл матрицы — циано-4-гидроксикоричной кислоты — в концентрации 20 мкг/мкл. Полученные пептидные спектры обрабатывали с использованием поисковой базы SwissPROT (<http://prospector.ucsf.edu>).

Ламинин-1 выделяли из саркомы Engelbreth—Holm—Sworm (EHS) мыши с помощью модифицированного нами метода (Palm, Furcht, 1983; Черепанова и др., 2002).

Анализ адгезии клеток гепатомы Зайдела проводили в 24-луночных планшетах (Flow, Scotland). В лунки наносили ламинин-1 в 10 мМ натрий-фосфатном буферном растворе с 0.15 М NaCl (PBS) в концентрации 10 мкг/мл по 0.5 мл и инкубировали ночь при 4 °С, далее лунки промывали PBS и блокировали места неспецифического связывания раствором бычьего сывороточного альбумина в 20 мМ PBS в концентрации 15 мг/мл в течение 30 мин при 22 °С. Клетки гепатомы Зейдела, отмытые от асцитической жидкости физиологическим раствором, наносили по  $1.6 \cdot 10^6$  клеток в пробирки и преинкубировали с иммуносывороткой или нормальной сывороткой кролика в трех разных дозах (500 мкг, 1 и 2 мг) при 22 °С при постоянном перемешивании. Спустя 20 мин клетки отмывали PBS, разводили средой DMEM («Биолот», Россия) и наносили в лунки, покрытые ламинином, по  $400 \cdot 10^5$  клеток на лунку. Таким образом, концентрации IgG, с которыми были преинкубированы клетки, составили соответственно 125, 250 и 500 мкг для каждой лунки. Инкубацию клеток проводили при 37 °С в течение 40 мин, затем не связавшиеся с ламинином клетки отмывали и клетки в лунках фиксировали 4%-ным формальдегидом в PBS. Клетки подсчитывали с использованием инвертированного микроскопа. Для каждого варианта обсчитывали по 4 поля зрения в 4 лунках в трех опытах. При статистической обработке данных использовали программу Origin 6.0.

### Результаты

Чтобы определить наличие в антипочечной сыворотке антител к рецепторам ламинина, мы исследовали способность указанной сыворотки ингибировать присоединение клеток гепатомы Зайдела к субстрату, покрытому ламинином. Результаты проведенных экспериментов показали, что преинкубация опухолевых клеток с антипочечной сывороткой приводит к уменьшению числа прикрепившихся клеток в дозозависимой манере. Так, добавление к клеткам 125 мкг антител на лунку ингибирует присоединение клеток к ламинину в среднем на 44 %, 250 мкг/лунку — на 56 %, а 500 мкг антител — на 77 % (рис. 1). Такие результаты позволяют сделать вывод о наличии в антипочечной сыворотке специфических антител, которые способны блокировать некоторые рецепторы к ламинину на поверхности клеток гепатомы Зайдела.

Для выделения специфических мембранных компонентов, участвующих в присоединении клеток к ламинину, лизат белков плазматических мембран клеток гепатомы Зайдела был нанесен на колонку с ламинин-сефарозой. Основными белками, элюированными с колонки 0.1 М глицином (pH 2.4), оказались компоненты

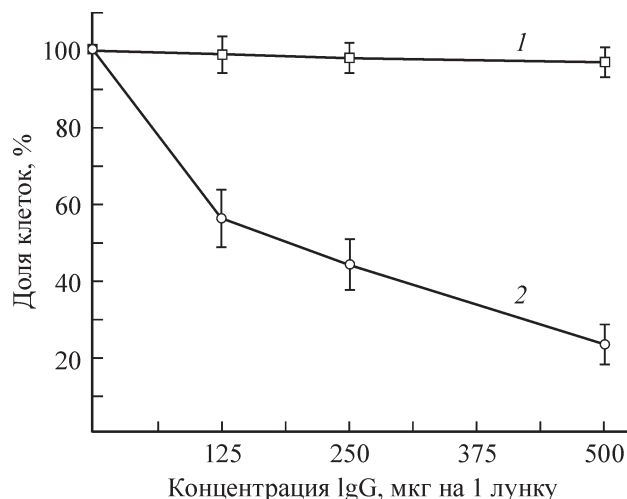


Рис. 1. Влияние антипочечной иммуносыворотки на прикрепление клеток гепатомы к субстрату, покрытому ламинином.

1 — преинкубация клеток с нормальной сывороткой кролика, 2 — преинкубация клеток с антипочечной иммуносывороткой. Число клеток, прикрепившихся к ламинину без обработки сыворотками, принято за 100 %.

Fig. 1. Effect of the anti-kidney immunoserum on the attachment of hepatoma cells to laminin-substratum.

1 — cells preincubated with the normal rabbit serum, 2 — cells preincubated with the anti-kidney immunoserum. The number of cells attached on laminin without immunoserum preincubations was taken as 100 %.

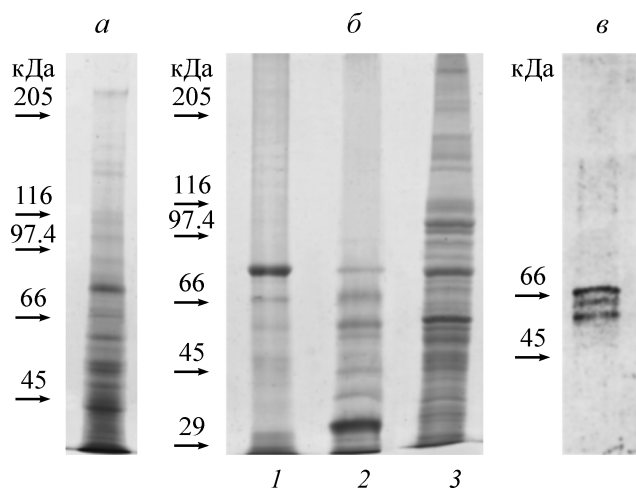
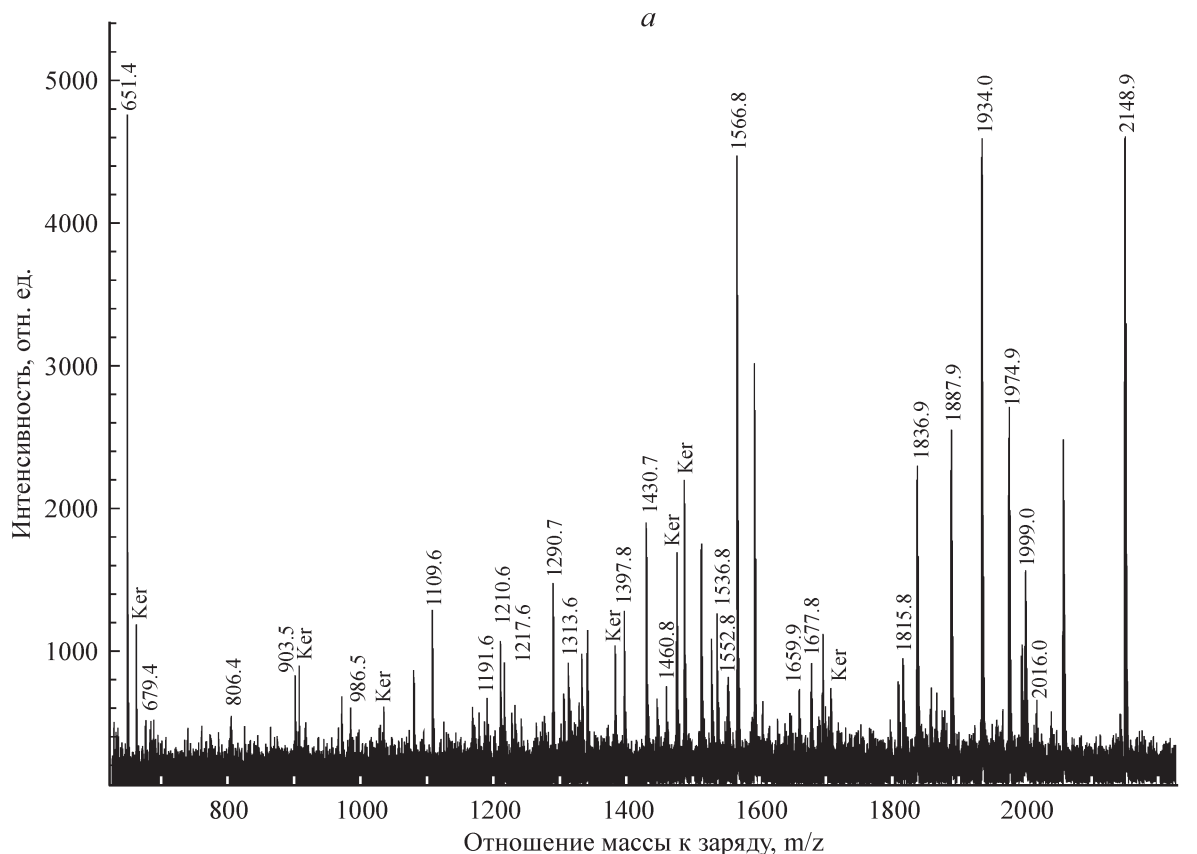


Рис. 2. Выделение белков плазматических мембран клеток гепатомы Зайдела методом аффинной хроматографии на ламинин-сефарозе.

a — белки, элюированные с колонки 0.1 М глицином, pH 2.4. б — белки, выделенные в присутствии  $MnCl_2$ ; дорожка 1 — элюция с колонки ЭДТА; дорожка 2 — элюция 0.1 М глицином, pH 2.4; дорожка 3 — общий лизат белков плазматических мембран клеток гепатомы Зайдела, наносимый на аффинную колонку. в — иммуноблоттинг выделенных на колонке с ламинин-сефарозой белков (элюция 0.1 М глицином, pH 2.4) с антипочечной иммуносывороткой.

Fig. 2. Laminin affinity chromatography of Zajdela hepatoma cells plasma membrane proteins.

a — proteins eluted from affinity column by 0.1 M glycine, pH 2.4. б — proteins prepared in the presence of  $MnCl_2$ ; lane 1 — protein elution by EDTA; lane 2 — protein elution by 0.1 M glycine, pH 2.4; lane 3 — the whole lysate of Zajdela hepatoma cell plasma membranes proteins. в — Western blotting analysis of proteins eluted from affinity column by 0.1 M glycine, pH 2.4, with anti-kidney immunoserum.



б

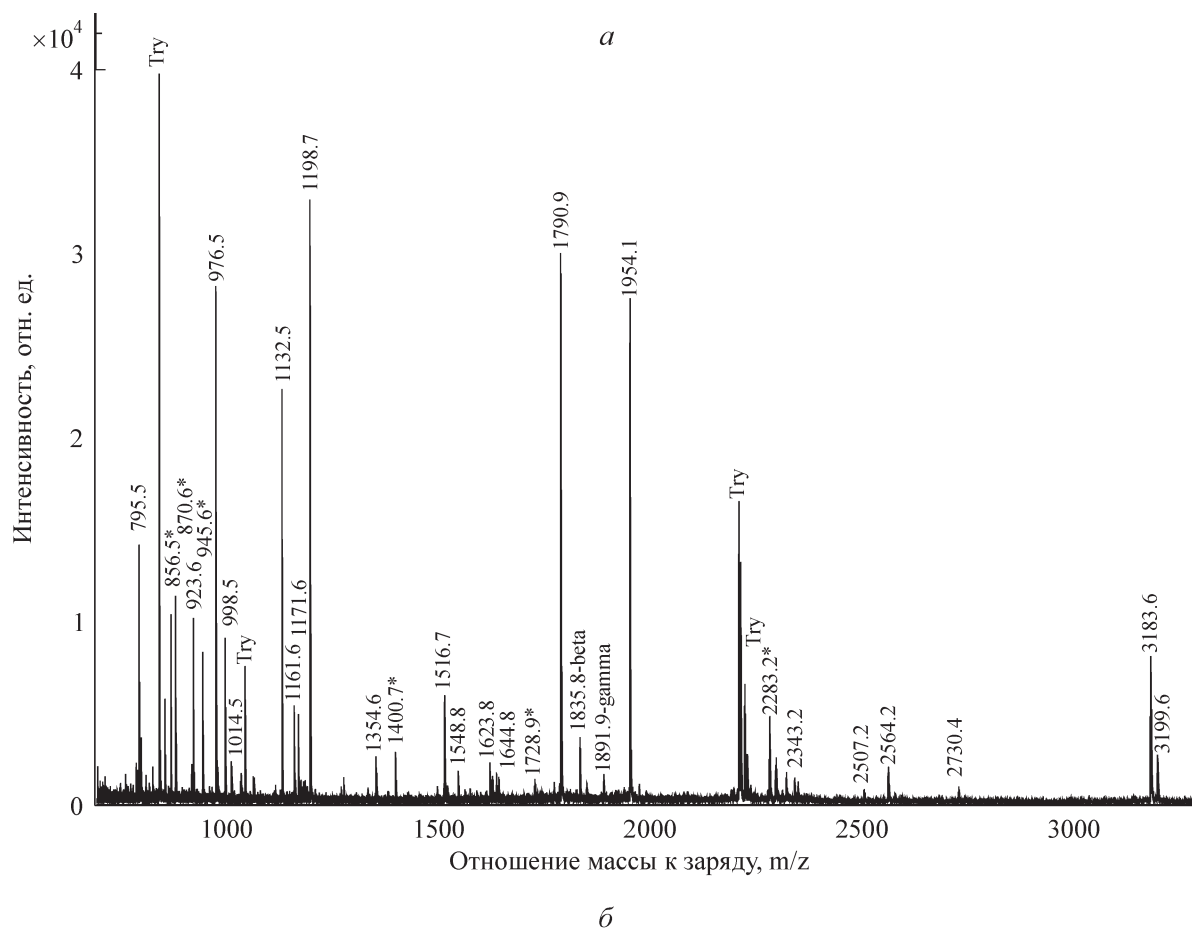
1 11 21 31 41 51 61 71  
 MKFTVVAAL LLLCAVRAEE EDKKEDVGTV VGIDLGTTYS CVGVFKNGRV **EIANDQGNR** **ITPSYVAFTP** **EGERLIGDAA**  
 81 91 101 111 121 131 141 151  
**KNQLTSNPEN** **TVFDAKRLIG** **RTWNDPSVQQ** **DIKFLPFKVV** **EKKTKPYIQV** **DIGGGQTKTF** **APEEISAMVL** **TKMKETAEEY**  
 161 171 181 191 201 211 221 231  
**LGKKVTHAVV** **TVPAYFNDAAQ** **RQATKDAGTI** **AGLNMRIIN** **EPTAAAIAYG** **LDKREGEKNI** **LVFDLGGGTF** **DVSLLTIDNG**  
 241 251 261 271 281 291 301 311  
**VFEVVATNGD** **THLGGEDFDQ** **RVMEHFILY** **KKKTGKDVRK** **DNRAVOKLRR** **EVEKAKRALS** **SOHQARIEIE** **SFFEGEDEFSE**  
 321 331 341 351 361 371 381 391  
**TLTRAKFEEL** **NMDLFRSTMK** **PVOKVLESD** **LKKSIDEIV** **LVGGSTRIPK** **IQQLVKEFFN** **GKEPSRGINP** **DEAVAYGAAV**  
 401 411 421 431 441 451 461 471  
**QAGVLSGDQD** **TGDLVLLDVC** **PLTLGIETVG** **GVMTKLIPRN** **TVVPTKKSQI** **ESTASDNOPT** **VTIKVYEGER** **PLTKDNHLLG**  
 481 491 501 511 521 531 541 551  
**TFDLTGIPPA** **PRGVPOIEVT** **FEIDVNGILR** **VTAEDKGTGN** **KNKITITNDQ** **NRLTPEEIER** **MVNDAEKFAE** **EDKKLKERID**  
 561 571 581 591 601 611 621 631  
**TRNELESYAY** **SLKNQIGDKE** **KLGGKLSPED** **KETMEKAVEE** **KIEWLESHOD** **ADIEDFKAKK** **KELEEIVQPI** **ISKLYGSGGP**  
 641 651  
 PPTGEEDTSE KDEL

Рис. 3. Характеристика белка плазматических мембран клеток гепатомы с мол. массой около 80 кДа, выделенного на ламинин-сепарозе и идентифицированного как GRP78 методом масс-спектрометрии.

*a* — масс-спектр пептидов, полученных в результате трипсинолиза белка с мол. массой около 80 кДа; *цифрами* отмечены сигналы для пептидов GRP78, Ker — привнесенное загрязнение пробы кератином человека; *б* — выявленные пептиды показаны на аминокислотной последовательности белка GRP78 жирным подчеркнутым шрифтом.

Fig. 3. MS spectra of tryptic peptides of the protein with mol. weight about 80 kDa, isolated by laminin affinity chromatography and identified as GRP78 (*a*).

*Digits* indicate tryptic peptide of GRP78, Ker — introduced contamination of a sample by human hair keratin. The determined peptides are shown in the amino acid sequence of rat GRP78 with bold and underlined font (*b*). The matched tryptic peptide sequences of the about 80 kDa protein band in rat GRP78 (shown in bold and underlined font).



β-актин

1	11	21	31	41	51	61	71
<b>MDDIAALV</b>	<b>DNGSGMCKAG</b>	<b>FAGDDAPRAV</b>	<b>FPSIVGRPRH</b>	<b>QGVVMVGMGQK</b>	<b>DSYVGDEAQS</b>	<b>KRGILTLYP</b>	<b>IEHGIVTNWD</b>
81	91	101	111	121	131	141	151
DMEKIWHNTF	YNELR <b>V</b> APEE	<b>HPVLLTEAPL</b>	<b>NP</b> KANREKMT	QIMFETFNTP	AMYVAIQAVL	SLYASGR <b>TTG</b>	<b>IVMDSGDGVT</b>
161	171	181	191	201	211	221	231
<b>HTVPIYEGYA</b>	<b>LPHAILRLDL</b>	<b>AGRDLDYLM</b>	<b>KILTERGYSE</b>	<b>TTAEREIVR</b>	DIKEKLCYVA	<b>LD</b> FEQEMATA	<b>ASSSLEKSY</b>
241	251	261	271	281	291	301	311
<b>ELPDGQVITI</b>	<b>GNER</b> FRCPEA	LFQPSFLGME	SCGIHETTFN	SIMK <b>CDVDIR</b>	<b>KDLYANTVLS</b>	<b>GGTTMYPGIA</b>	<b>DRMQKEITAL</b>
321	331	341	351	361	371		
<b>APSTMKIKII</b>	<b>APPERKYSVW</b>	<b>IGGSILASLS</b>	<b>TFQQMWSKQ</b>	<b>EYDESGPSIV</b>	<b>HRKCF</b>		

γ-актин

1	11	21	31	41	51	61	71
<b>MEEEIAALVI</b>	<b>DNGSGMCKAG</b>	<b>FAGDDAPRAV</b>	<b>FPSIVGRPRH</b>	<b>QGVVMVGMGQK</b>	<b>DSYVGDEAQS</b>	<b>KRGILTLYP</b>	<b>IEHGIVTNWD</b>
81	91	101	111	121	131	141	151
DMEKIWHNTF	YNELR <b>V</b> APEE	<b>HPVLLTEAPL</b>	<b>NP</b> KANREKMT	QIMFETFNTP	AMYVAIQAVL	SLYASGR <b>TTG</b>	<b>IVMDSGDGVT</b>
161	171	181	191	201	211	221	231
<b>HTVPIYEGYA</b>	<b>LPHAILRLDL</b>	<b>AGRDLDYLM</b>	<b>KILTERGYSE</b>	<b>TTAEREIVR</b>	DIKEKLCYVA	<b>LD</b> FEQEMATA	<b>ASSSLEKSY</b>
241	251	261	271	281	291	301	311
<b>ELPDGQVITI</b>	<b>GNER</b> FRCPEA	LFQPSFLGME	SCGIHETTFN	SIMK <b>CDVDIR</b>	<b>KDLYANTVLS</b>	<b>GGTTMYPGIA</b>	<b>DRMQKEITAL</b>
321	331	341	351	361	371		
<b>APSTMKIKII</b>	<b>APPERKYSVW</b>	<b>IGGSILASLS</b>	<b>TFQQMWSKQ</b>	<b>EYDESGPSIV</b>	<b>HRKCF</b>		

Рис. 4. Характеристика белка плазматических мембран клеток гепатомы с мол. массой около 43 кДа, выделенного с колонки с ламинин-сефарозой и идентифицированного как цитоплазматический актин (β и γ) методом масс-спектрометрии.

a — масс-спектр пептидов, полученных в результате трипсинолиза белка с мол. массой около 43 кДа; цифрами отмечены сигналы для пептидов актина, звездочкой отмечены пептиды, полученные в результате неспецифического расщепления актина; Try — пептиды трипсина, полученные в результате его автогидролиза. б — выявленные пептиды показаны на аминокислотной последовательности актинов жирным подчеркнутым шрифтом.

Fig. 4. MS spectra of tryptic peptides of the protein with mol. weight about 43 kDa, isolated by laminin affinity chromatography and identified as cytoplasmic actin (β, γ) (a).

Digits indicate tryptic peptide of actin, asterisk — peptides obtained as a result of nonspecific cleavage of actin; Try — trypsin peptides obtained after trypsin autodigestion. б — the determined peptides are shown in the aminoacid sequences of rat cytoplasmic actins with bold and underlined font.

с мол. массами около 80, 67, 60, 55, 52, 48 и 43 кДа (рис. 2, а). В иммуноблотинге три белка реагировали с антипочечной сывороткой — 67, 60 и 55 кДа (рис. 2, в).

Выделение интегриновых рецепторов проводят в присутствии дивалентных катионов, таких как  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  и  $\text{MnCl}_2$ , при физиологических ионной силе и pH растворов. Использование нами хлорида марганца было обусловлено литературными данными о выделении интегриновых рецепторов ламинина клеток меланомы (Kramer et al., 1989) и гепатоцитов (Forsberg et al., 1990), где авторы при сравнении результатов выделения этих рецепторов с применением разных дивалентных катионов отдают предпочтение  $\text{MnCl}_2$ . Таким образом, при выделении мембранных белков на аффинной колонке в присутствии  $\text{MnCl}_2$  мы ожидали выявить интегриновые рецепторы к ламинину. Однако элюция раствором ЭДТА белков, связавшихся с ламинином, обнаружила лишь один основной компонент с мол. массой около 80 кДа (рис. 2, б). В высокомолекулярной области можно различить несколько белковых полос, схожих по молекулярной массе с интегринными, но они слабо выражены. В последующей фракции белков, элюируемой 0.1 М глицином, pH 2.4, нами было выявлено несколько компонентов с мол. массами около 80, 67, 55, 52, 43, 37 и 32 кДа.

Нам удалось идентифицировать некоторые из этих компонентов методом масс-спектрометрии. Белки, элюированные с аффинной колонки, разделяли электрофоретически в 5%-ном полиакриламидном геле, визуализировали окрашиванием Кумасси, вырезали и расщепляли трипсином, затем их анализировали на масс-спектрометре MALDI TOF Bruker reflex IV. Массы полученных пептидов были использованы для идентификации белков в поисковой базе данных Swiss-PROT.

Полученный пептидный спектр компонента с мол. массой около 80 кДа (рис. 3, а) соответствует белку с мол. массой 78 кДа — glucose-regulated protein precursor (GRP78); обнаруженные пептиды перекрывают 58 % последовательности этого белка (рис. 3, б). Белок GRP78 принадлежит к высококонсервативному семейству белков теплового шока с мол. массой 70 кДа (70 кДа БТШ) и известен как шаперон, локализованный в эндоплазматическом ретикулууме. Однако недавние исследования обнаружили, что белки теплового шока, в том числе семейства 70 кДа БТШ, экспрессируются на поверхности клеток различного происхождения.

Компонент с мол. массой около 43 кДа соответствует пептидной карте актина (бета- и гамма-актин при одинаковом перекрывании последовательностей белков — 72 %; рис. 4, б). Пептидный спектр показан на рис. 4, а. По-видимому, этот белок выделяется с аффинной колонки, будучи связанным с одним из трансмембранных компонентов, реагирующих с ламинином.

Пептидные карты белков с мол. массами около 67 и 55 кДа отображают, вероятно, смесь нескольких компонентов. Так, например, в образце с мол. массой около 67 кДа мы обнаружили часть пептидов, характерных для сывороточного альбумина который, как показано (Von der Mark, Risse, 1987; Mecham, 1991), может загрязнять препараты мембран клеток и быть сопутствующим белком, элюируемым с аффинной колонки с ламинин-сефарозой. Также выявлены сигналы, характерные для 67 РЛ и его предшественника с мол. массой 32 кДа (32 РЛ), но они слабее по интенсивности относительно всего остального спектра — минорный компо-

нент. Поэтому для точной идентификации этих белков необходимо использовать дополнительные способы их разделения.

## Обсуждение

Взаимодействие гепатоцитов с внеклеточным матриксом играет важную роль при развитии печени, ее регенерации и опухолевой трансформации. Связывание клеток с матриксом опосредуется через рецепторы клеточной поверхности, часть которых принадлежит к семейству интегринов и является хорошо изученной. Гепатоциты *in vitro* присоединяются к субстрату, покрытому ламинином. Более того, в клетках первичной культуры гепатоцитов уже спустя 4 ч после диссоциации ткани обнаруживают высокий уровень мРНК для  $\gamma 1$ -цепи ламинина, а также для  $\beta 1$ -цепи ламинина, тогда как в свежесделанных гепатоцитах они едва различимы (Rescan et al., 1990; Levavasseur et al., 1996). Таким образом, в ответ на стресс первичная культура гепатоцитов сама способна синтезировать и секретировать в среду ламинин (Clement et al., 1988) и, синтезируя рецепторы к ламинину, взаимодействовать с ним.

Компоненты плазматической мембраны гепатоцитов, связывающиеся с ламинином, наиболее полно охарактеризованы в работе Клемента с сотрудниками (Clement et al., 1990). В этой работе методом аффинной хроматографии на колонке с ламинин-сефарозой было выделено несколько белковых компонентов с мол. массами около 80, 67, 55, 45, 38—36 и 32 кДа, что близко к полученным нами результатам для клеток асцитной гепатомы Зайдела. Авторы показали способность этих компонентов присоединяться к различным сайтам молекулы ламинина, однако до сих пор эти связывающие ламинин белки не идентифицированы, и в обзорах по рецепторам к ламинину на эту работу ссылаются, упоминая лишь молекулярную массу выделенных компонентов. Белок с мол. массой 67 кДа, выявленный в обсуждаемом нами исследовании Клемента с сотрудниками, реагировал с антителами, полученными против бактериального белка, созданного методом рекомбинантных ДНК в результате слияния кодирующих последовательностей генов  $\beta$ -галактозидазы и 32 кДа-предшественника 67 кДа-рецептора ламинина (32/67 РЛ), однако не обнаруживался антителами против участка  $\text{NH}_2$ -конца 32/67 РЛ. По таким результатам затруднительно сделать вывод о том, что выделенный из мембран гепатоцитов компонент с мол. массой 67 кДа является 67 РЛ, учитывая тот факт, что этот компонент не связывался с известной специфической последовательностью  $\beta 1$ -цепи ламинина для этого рецептора — YIGSR, а реагировал с пептидом PA22-2  $\alpha 1$ -цепи ламинина, содержащим последовательность IKVAV, с которой способны связываться лектины (Mecham, 1991). По-видимому, это может быть другой белок, отличный от 67 РЛ.

Согласно литературным данным, уровень мРНК для 32/67 РЛ в 3 раза выше в клетках первичной культуры гепатоцитов и в 10 раз выше в культивируемых клетках гепатомы, чем в нормальных гепатоцитах (Rescan et al., 1991), а также значительно повышен в клетках гепатоцеллюлярной карциномы (Ozaki et al., 1998). Поэтому мы ожидали, что компонент с мол. массой около 67 кДа, выявленный среди элюируемых с колонки мембранных белков гепатомных клеток, связывающихся с ламини-

ном, окажется 32/67 РЛ. Однако нам это не удалось доказать. Причиной такого результата могло стать конкурентное связывание собственного синтезируемого клетками гепатомы ламинина, который прочно ассоциирован с плазматическими мембранами, возможно, именно через 32/67 РЛ и от которого нам не удалось избавиться кратковременной предобработкой мембран 0.5 М NaCl.

При выделении интегринных рецепторов клеток гепатомы Зайдела мы получили результаты, схожие с полученными Клементом с сотрудниками (Clement et al., 1990) на гепатоцитах крысы. Как и в названной выше работе, основным элюируемым компонентом оказался белок с мол. массой около 80 кДа. Однако примененная в исследовании этих авторов длительная (более 1 нед) экспозиция геля с радиоактивно мечеными мембранными белками, элюированными с колонки, позволила обнаружить компоненты, молекулярная масса которых соответствует интегринным рецепторам. Возможно, интегрины не первыми вовлекаются в присоединение данных клеток к ламинину или необходимы более физиологичные условия при их выделении.

Интересен факт идентификации белка, элюируемого с колонки с ламинин-сефарозой, с мол. массой около 80 кДа как GRP78. Этот белок принадлежит к семейству 70 кДа БТШ и был изначально охарактеризован как шаперон и  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий белок, локализованный в эндоплазматическом ретикулуме многих типов клеток (Munro, Pelham, 1986; Little et al., 1994). Ответ на стресс — это защитный механизм, который позволяет клеткам реагировать на неблагоприятные условия, угрожающие их выживанию. Такие условия могут заключаться в систематической вирусной инфекции, местном воспалении или в нерегулируемом росте опухолевых клеток. Клетки отвечают на эти условия индукцией синтеза небольшого числа эволюционно консервативных белков, примером которых являются белки теплового шока и GRPs. Потенциальными индукторами транскрипции гена *grp78* являются глюкозное и кислородное голодание и (или) воздействие тапсигаргином, при котором истощаются  $\text{Ca}^{2+}$ -депо эндоплазматического ретикулума (Li et al., 1993). Повышение уровня экспрессии этого белка наблюдается и в клетках прогрессивно растущих опухолей (Patierno et al., 1987; Cai et al., 1993; Gazit et al., 1995), что защищает эти клетки не только от апоптоза благодаря способности GRP78 контролировать процессинг белков и участвовать в высвобождении регуляторных веществ, но и от токсического эффекта фактора некроза опухолей и лизиса цитотоксическими лимфоцитами (Sugawara et al., 1990, 1993; Jamora et al., 1996). Однако работы последних лет показали, что GRP78 экспрессируется и на поверхности клеток (Delpino et al., 1998; Triantafilou et al., 2001; Delpino, Gastelli, 2002; Liu et al., 2003; Shin et al., 2003; Arap et al., 2004; Misra et al., 2005). Будучи локализованным на клеточной поверхности, GRP78 выполняет рецепторные, пептидсвязывающие функции, в том числе принимая участие и в ряде патологических процессов. Так, GRP78 обнаружен на эндотелиальных клетках в очагах атеросклеротических нарушений (Liu et al., 2003). Белок GRP78 может быть ассоциирован на клеточной поверхности с молекулами главного комплекса гистосовместимости I класса (хотя его присутствие не зависит от наличия этих молекул), и это взаимодействие существенно для вирусной интернализации в клетку-хозяина (Triantafilou et al., 2001, 2002). Так, было показано, что GRP78 является корецептором

для вируса Коксаки А9, который может быть причиной вялого паралича и хронической дилатационной кардиомиопатии, а также принимает участие в возникновении аутоиммунных расстройств, приводящих к инсулинзависимому сахарному диабету (Triantafilou et al., 2002). В этом взаимодействии GRP78 функционирует совместно с другим известным рецептором для этого вируса — интегрином  $\alpha_v\beta_3$ . На поверхности гепатоцитов был выявлен белок с мол. массой около 80 кДа, связывающийся с вирусом гепатита В, идентифицированный впоследствии как GRP78 (Ryu et al., 2000; Cho et al., 2003). Кроме того, GRP78 служит рецептором для  $\alpha_2$ -макроглобулина, взаимодействие с которым в норме происходит через два других клеточных рецептора и запускает каскад сигналов, приводящих к синтезу ДНК и пролиферации (Asplin et al., 2000). Таким образом, экспрессия опухолевыми клетками GRP78 позволяет им через взаимодействие с  $\alpha_2$ -макроглобулином получать дополнительные ростовые стимулы. Кстати, синтез  $\alpha_2$ -макроглобулина является маркером для пренеопластических и неопластических нарушений в печени, которые не обнаруживаются другими установленными маркерами (Sukata et al., 2004). Связывание GRP78 с ламинином впервые выявлено нами, и биологическая роль этого взаимодействия будет исследована в дальнейшем.

Цитоплазматический актин, выявленный и идентифицированный нами методом масс-спектрометрии — высококонсервативный белок, который существует в большинстве типов клеток как компонент цитоскелета и опосредует клеточную подвижность. Актин соединен с рядом рецепторов клеточной поверхности, такими, например, как интегрины, и может быть выявлен в препаратах мембранных белков. По-видимому, этот белок выделяется с аффинной колонки, будучи связанным с одним из трансмембранных компонентов, реагирующих с ламинином.

Таким образом, клетки асцитной гепатомы Зайдела связываются с ламинином через различные белки клеточной поверхности. Один из них с мол. массой 80 кДа идентифицирован нами масс-спектрометрическим методом как GRP78. Подтверждение полученных данных специфическими антителами и функциональная роль взаимодействия GRP78 с ламинином будут предметом наших последующих исследований.

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

#### Список литературы

- Терюкова Н. П., Иванов В. А. 1993. Выделение и характеристика мембранных гетероорганных антигенов почечной природы, ассоциированных с гепатомой Зайдела. Цитология. 35 (8) : 59—63.
- Тюреева И. И., Миргородская О. А., Черепанова О. А., Подольская Е. П., Новиков А. В., Ходорковский М. А., Иванов В. А. 2005. Выявление и идентификация ламинина в составе плазматических мембран клеток асцитной гепатомы Зайдела крысы. Цитология. 47 (2) : 150—162.
- Черепанова О. А., Калмыкова Н. В., Воронкина И. В., Аре А. Ф., Горелик Ю. В., Пинаев Г. П. 2002. Различия в характере взаимодействия нормальных и трансформированных кератиноцитов человека с изоформами ламинина. Цитология. 44 (2) : 151—158.
- Albrechtsen R., Wewer U. M., Thorgeirsson S. S. 1988. De novo deposition of laminin-positive basement membrane *in vitro* by

- normal hepatocytes and during hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 8 : 538—546.
- Amenta P. S., Harrison D. 1997. Expression and potential role of the extracellular matrix in hepatic ontogenesis: a review. *Microw. Res. Techn.* 39 : 372—386.
- Anilkumar N., Sudhakaran P. R. 1993. Isolation and characterization of laminin binding protein from regenerating rat liver plasma membrane. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 31 : 201—209.
- Arap M. A., Lahdenranta J., Mintz P. J., Hajitou A., Sarkis A. S., Arap W., Pasqualini R. 2004. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer Cell*. 6 : 275—284.
- Asplin I. R., Misra U. K., Gawdi G., Gonzalez-Gronow M., Pizzo S. V. 2000. Selective upregulated expression of the alpha 2-macroglobulin signalling receptor in highly metastatic 1-LN prostate carcinoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 383 : 135—141.
- Beloshapkina T. D., Abelev G. I. 1965. Immunohistochemical characteristics of insoluble mouse liver cell antigens. *J. Folia Biologica*. 11 : 472—477.
- Cai J. W., Henderson B. W., Shen J. W., Subjeck J. R. 1993. Induction of glucose regulated proteins during growth of a murine tumor. *J. Cell. Physiol.* 154 : 229—237.
- Carlsson R., Engvall E., Freeman A., Ruoslahti E. 1981. Laminin and fibronectin cell adhesion: enhanced adhesion of cells from regenerating liver to laminin. *PNAS*. 78 : 2403—2406.
- Gho D.-Y., Yang G.-H., Ryu C. J., Hong H. J. 2003. Molecular chaperone GRP78/BiP interacts with the large surface protein of hepatitis B virus *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* 77 : 2784—2788.
- Clement B., Rescan P. Y., Baffet G., Loreal O., Lehry D., Campion J. P., Cuillouzo A. 1988. Hepatocytes may produce laminin in fibrotic liver and in primary culture. *Hepatology*. 8 : 794—803.
- Clement B., Sequi-Real B., Savagner P., Kleinman H. K., Yamada Y. 1990. Hepatocyte attachment to laminin is mediated through multiple receptors. *J. Cell Biol.* 110 : 185—192.
- Delpino A., Castelli M. 2002. The 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78/BIP) is expressed on the cell membrane, is released into cell culture medium and is also present in human peripheral circulation. *Biosci. Rep.* 22 : 407—420.
- Delpino A., Piselli P., Vismara D., Vendetti S., Colizzi V. 1998. Cell surface localization of the 78 kD glucose-regulated protein (GRP 78) induced by thapsigargin. *Mol. Membr. Biol.* 15 : 21—26.
- Forsberg E., Paulsson M., Timpl R., Johansson S. 1990. Characterization of a laminin receptor on rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 265 : 6376—6381.
- Gazit G., Kane S. E., Nichols P., Lee A. S. 1995. Use of the stress-inducible grp78/BiP promoter in targeting high level gene expression in fibrosarcoma *in vivo*. *Cancer Res.* 55 : 1660—1663.
- Giannelli G., Fransvea E., Bergamini C., Marinosci F., Antonaci S. 2003. Laminin-5 chains are expressed differentially in metastatic and nonmetastatic hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 9 : 3684—3691.
- Haeffner E. W., Kolbe K., Schroeter D., Paweletz N. 1980. Isolation of a light and a heavy membrane-fraction of the glucose-free Ehrlich—Lettré substrain. *Biochim. biophys. acta.* 603 : 36—51.
- Jamora C., Dennert G., Lee A. S. 1996. Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 : 7690—7694.
- Kato S., Otsu K., Ohtake K., Kimura Y., Yashiro T., Suzuki T., Akamatsu N. 1992. Concurrent changes in sinusoidal expression of laminin and affinity of hepatocytes to laminin during rat liver regeneration. *Exp. Cell Res.* 198 : 59—68.
- Kramer R. H., McDonald K. A., Vu M. P. 1989. Human melanoma cells express a novel integrin receptor for laminin. *J. Biol. Chem.* 264 : 15 642—15 649.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* 237 : 680—685.
- Levasseur F., Lietard J., Ogawa K., Theret N., Burbe- lo P. D., Yamada Y., Guillouzo A., Clement B. 1996. Expression of laminin gamma 1 cultured hepatocytes involves repeated CTC and GC elements in LAMC1 promoter. *Biochem. J.* 313 : 745—752.
- Li W. W., Alexandre S., Cao C., Lee A. S. 1993. Transactivation of the grp78 promoter by Ca<sup>2+</sup> depletion. A comparative analysis with A23187 and the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitor thapsigargin. *J. Biol. Chem.* 268 : 12 003—12 009.
- Little E., Ramakrishnan M., Roy B., Gazit G., Lee A. S. 1994. The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression*. 4 : 1—18.
- Liu C., Bhattacharjee G., Boisvert W., Dilley R., Edgington T. 2003. *In vivo* interrogation of the molecular display of atherosclerotic lesion surfaces. *Amer. J. Pathol.* 163 : 1859—1871.
- Markwell M. A. K., Haas S. V., Bieber L. L., Tolbert N. E. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87 : 206—210.
- Martinez-Hernandez A., Amenta P. S. 1993. The hepatic extracellular matrix. II. Ontogenesis, regeneration and cirrhosis. *Virc-hows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 423 : 77—84.
- Martinez-Hernandez A., Amenta P. S. 1995. Liver regeneration I: the extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J.* 9 : 1401—1410.
- Matsumoto S., Yamamoto K., Nagano T., Okamoto R., Ibusaki N., Tagashira M., Tsuji T. 1999. Immunohistochemical study on phenotypical changes of hepatocytes in liver disease with reference to extracellular matrix composition. *Liver*. 19 : 32—38.
- Mecham R. P. 1991. Receptors for laminin on mammalian cells. *FASEB J.* 5 : 2538—2546.
- Misra U. K., Gonzalez-Gronow M., Gawdi G., Pizzo S. V. 2005. The role of MTJ-1 in cell surface translocation of GRP78, a receptor for alpha<sub>2</sub>-macroglobulin-dependent signaling. *J. Immunol.* 174 : 2092—2097.
- Munro S., Pelham H. R. B. 1986. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell*. 46 : 291—300.
- Nejjari M., Hafdi Z., Dumortier J., Bringuier A. F., Feldman G., Scoazec J. Y. 1999. Alpha6beta1 integrin expression in hepatocarcinoma cells: regulation and role in cell adhesion and migration. *Int. J. Cancer.* 83 : 518—525.
- Ozaki I., Yamamoto K., Mizuta T., Kajihara S., Fukushima N., Setoguchi Y., Morito F., Sakai T. 1998. Differential expression of laminin receptors in human hepatocellular carcinoma. *Gut*. 43 : 837—842.
- Palm S. L., Furcht L. T. 1983. Production of laminin and fibronectin by Schwannoma cells: cell-protein interactions *in vitro* and protein localization in peripheral nerve *in vivo*. *J. Cell Biol.* 96 : 1218—1226.
- Patierno S. R., Tuscano J. M., Landolph J. R., Lee A. S. 1987. Increased expression of the glucose-regulated gene encoding the Mr 78,000 glucose-regulated protein in chemically and radiation-transformed C3H 10T1/2 mouse embryo cells. *Cancer Res.* 47 : 6620—6624.
- Rescan P. Y., Clement B., Yamada Y., Glaise D., Sequi-Real B., Guguen-Guillouzo C., Guillouzo A. 1991. Expression of laminin and its receptor LBP-32 in human and rat hepatoma cells. *Hepatology*. 13 : 289—296.
- Rescan P. Y., Clement B., Yamada Y., Segni-Real B., Baffet G., Guguen-Guillouzo C., Guillouzo A. 1990. Differential expression of laminin chains and receptor (LBP-32) in fetal and neoplastic hepatocytes compared to normal adult hepatocytes *in vivo* and in culture. *Amer. J. Pathol.* 137 : 701—709.
- Ryu C. J., Cho D.-Y., Gripon P., Kim H. S., Guguen-Guillouzo C., Hong H. J. 2000. An 80-kilodalton protein that binds to the pre-S1 domain of hepatitis B virus. *J. Virol.* 74 : 110—116.
- Sell S., Ruoslahti E. 1982. Expression of fibronectin and laminin in the rat liver after partial hepatectomy, during carcinogenesis, and in transplantable hepatocellular carcinomas. *J. Nat. Cancer Inst.* 69 : 1105—1114.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68 : 850—858.



Shin B. K., Wang H., Yim A. M., Naour F. L., Brichory F., Jang J. H., Zhao R., Puravs E., Tra J., Michael C. W., Misk D. E., Hanash S. M. 2003. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *J. Biol. Chem.* 278 : 7607—7616.

Sugawara S., Nowicki M., Xie S., Song H. W., Dennert G. 1990. Effects of stress on lysability of tumor targets by cytotoxic T cells and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 145 : 1991—1998.

Sugawara S., Takeda K., Lee A., Dennert G. 1993. Suppression of stress protein GRP78 induction in tumor B/C10ME eliminates resistance to cell mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* 53 : 6001—6005.

Sukata T., Uwagawa S., Ozaki K., Sumida K., Kikuchi K., Kushida M., Saito K., Morimura K., Oeda K., Okuno Y., Mikami N., Fukushima S. 2004.  $\alpha_2$ -Macroglobulin: a novel cytochemical marker characterizing preneoplastic and neoplastic rat liver lesions negative for hitherto established cytochemical markers. *Amer. J. Pathol.* 165 : 1479—1488.

Triantafilou K., Fradelizi D., Wilson K., Triantafilou M. 2000. GRP78, a coreceptor for coxsackievirus A9, interacts with major histocompatibility complex class I molecules which mediate virus internalization. *J. Virol.* 76 : 633—643.

Triantafilou M., Fradelizi D., Triantafilou K. 2001. Major histocompatibility class one molecule associates with glucose regulated protein (GRP) 78 on the cell surface. *Hum. Immunol.* 62 : 764—770.

Von der Mark K., Risse G. 1987. Isolation and characterization of laminin receptors. *methods in Enzymology.* 144 : 490—507.

Wewer U. M., Engvall E., Paulsson M., Yamada Y., Albrecht-sen R. 1992. Laminin A, B1, B2, S and M subunits in the postnatal rat liver development and after partial hepatectomy. *Lab. Invest.* 66 : 378—389.

Yoshida K., Tadaoka Y., Manabe T. 1996. Expression of laminin in hepatocellular carcinoma: an adjunct for its histological diagnosis. *Jap. J. Clin. Oncol.* 26 : 70—76.

Поступила 24 V 2005

#### INTERACTION OF LAMININ WITH THE PLASMA MEMBRANE COMPONENTS OF ASCITIC ZAJDELA HEPATOMA CELLS

I. I. Tyuryaeva,<sup>1,\*</sup> O. A. Mirgorodskaya,<sup>1</sup> O. A. Cherepanova,<sup>1</sup> E. P. Podolskaya,<sup>2</sup> M. V. Serebryakova,<sup>3</sup> V. A. Ivanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, <sup>2</sup> Institute of Analytical Instrumentation RAS, St. Petersburg, and <sup>3</sup> Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Moscow;

\* e-mail: tii@mail.cytspb.rssi.ru

The laminin affinity chromatography was used for isolating laminin-binding proteins from the plasma membrane of Zajdela hepatoma cells synthesizing laminin. These were components with mol. weights about 80, 67, 60, 55, 52, 48 and 43 kDa. The isolation of laminin integrin receptors from plasma membranes of Zajdela hepatoma cells in the presence of MnCl<sub>2</sub> detected only a protein with mol. weight about 80 kDa in EDTA-elution conditions. This protein was identified by mass spectrometry method as the 78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP78). It belongs to the family of 70 kDa heat shock proteins, recently GRP78 was reported to be localized on the surface of different cell types, including hepatocytes.

Key words: hepatoma, laminin, laminin receptor, heat shock proteins, GRP78.