

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ ГЕПАТОМНЫХ И МИОГЕННЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИПОЧЕЧНОЙ СЫВОРОТКИ

© Н. П. Терюкова, А. С. Дешева, Г. И. Блинова, О. А. Миргородская, В. А. Иванов

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: iva@mail.cytspb.rssi.ru*

Продолжено изучение антигенной дивергенции опухолевых клеток, обусловленной экспрессией нормальных антигенов, присущих дефинитивным тканям органов, не гомологичных исследуемой опухоли, так называемых гетероорганных антигенов. С помощью антипочечной сыворотки в составе фракций плазматических мембран клеток асцитной гепатомы Зайдела и культивируемой гепатомы НТС крыс выявлены опухолеассоциированные гетероорганные антигены с мол. массами порядка 200—210 кДа (ранее идентифицированный как ламинин), 105—130, 75—80 (для клеток гепатомы Зайдела) и 43 кДа; последний выделен методом аффинной хроматографии на иммуносорбенте и идентифицирован масс-спектрометрически как цитоплазматический  $\beta$ -актин. Для решения вопросов о специфическом характере экспрессии выявленных антигенов в отношении гепатомных клеток и о сопряженности рассматриваемого феномена к пролиферативной активности клеток проведено тестирование поверхностных антигенов активно пролиферирующих и дифференцированных клеток иного гистогенеза. На поверхности культивируемых миобластоподобных миогенных клеток L8 и клеток L6J1, трансформированных метилхолантронном, а также дифференцированных клеток L6J1 антипочечная сыворотка также выявляет ламинин, синтез которого, по-видимому, гепатомными и миогенными клетками не сопряжен с их пролиферативной активностью; кроме того, обнаружены антигены с мол. массами около 38, 42, 44, 48, 62, 78 и 120 кДа, экспрессия которых на поверхности клеток может быть следствием их активной пролиферации и(или) дифференцировки. Например, возможно, что отсутствие  $\beta$ -актина во фракции плазматических мембран дифференцированных клеток L6J1 связано с иной организацией актина в миотубах, а именно с образованием миофибрилл.

Ключевые слова: гепатома, антигенная дивергенция, опухолеассоциированные антигены, миогенные клетки, масс-спектрометрия,  $\beta$ -актин, ламинин.

Принятые сокращения: ПААГ — полиакриламидный гель, SDS — додецилсульфат натрия, СПК — сыворотка плода коровы, ФБ — фосфатный буфер, ИФА — иммуноферментный анализ, ДЭНА — диэтилнитрозамин, ГК — гепатокарцинома.

Процесс неопластической трансформации связан с нарушением клеточной дифференцировки и сопровождается изменениями морфологических, биохимических и иммунологических характеристик ткани (Ходосова, 1988; Фель, 1990). Типичным проявлением малигнизации клеток является антигенная дивергенция. Ранее было показано, что органоспецифическая антипочечная иммуносыворотка, полученная путем иммунизации кроликов препаратом «клеточных теней» почек крысы и истощенная гомогенатом крысиной печени, при обработке срезов почки в реакции непрямой иммунофлуоресценции вызывает яркое свечение в базальных мембранах и щеточной каемке извитых канальцев почки, тогда как при обработке срезов печени флуоресценции клеточных структур не наблюдается (Иванов и др., 1975). В то же время при тестировании методом непрямой иммунофлуоресценции живых клеток асцитной гепатомы Зайдела, индуцированной в свое время у крыс скормливанием 4-диметиламинобензола, специфическое свечение «кольцевого» или «точечного» типа было обнаружено у 90—94 % опухолевых кле-

ток, тогда как с поверхностными антигенами интактных гепатоцитов антисыворотка не реагирует. Аналогично при обработке иммуносывороткой специфическое свечение развивается на поверхности клеток перевивных опухолей — крысиной рабдомиосаркомы РА-2 и мышинной гепатомы 22а, а также культивируемых клеток гепатоцеллюлярных опухолей НТС, 27 и миогенных клеток L6J1 (Терюкова и др., 1996; Teryukova et al., 1999).

Активное взаимодействие антипочечной сыворотки с антигенами фракций, обогащенных плазматическими мембранами крысиных клеток гепатомы Зайдела и рабдомиосаркомы РА-2, а также мышинной гепатомы 22а, подтверждено методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Приведенные данные свидетельствуют об экспрессии на поверхности активно пролиферирующих клеток перевивных опухолей и клеточных линий по крайней мере одного из органоспецифических антигенов почки и ставят вопрос о причастности этих гетероорганных антигенов к процессу клеточной пролиферации (Фель, 1990; Терюкова и др., 1996). Методом иммунопреципита-

ции в лизате клеток гепатомы Зайдела обнаружен гетероорганый антиген с мол. массой около 45 кДа (Teryukova et al., 1999), а методом иммуноблотинга — компонент с мол. массой порядка 200—210 кДа, идентифицированный методом масс-спектрометрии как ламинин (Тюряева и др., 2005).

Исследование экспрессии гетероорганых опухолеассоциированных антигенов на поверхности гепатоцитов крысы после воздействия гепатоканцерогенов и в функциональных тестах *in vitro* осложняется определенными методическими трудностями, связанными с их выделением и культивированием. В этой связи встал вопрос о возможности изучения проблемы антигенной дивергенции на другой доступной клеточной модели, в которой дифференцировка клеток достигается в культуре. Более того, изучение экспрессии гетероорганых антигенов на клетках иного гистогенеза может способствовать расширению наших представлений об универсальности такого рода событий при клеточной трансформации и решению вопроса о сопричастности их синтеза к процессу клеточной пролиферации.

Настоящее исследование направлено на дальнейшее изучение экспрессии органоспецифических антигенов, свойственных дефинитивной ткани почек, на поверхности гепатомных и миогенных клеток, их идентификацию и определение причастности этих антигенов к процессу клеточной пролиферации.

## Материал и методика

В опытах использовали беспородных крыс-самцов массой 120—150 г (питомник «Рапполово» РАМН). Суспензию гепатоцитов из печени интактных крыс получали в соответствии с рекомендациями Назарова и сотрудников (1989). Клетки перевиваемой гепатомы Зайдела осаждали из асцита крысы центрифугированием при 50 г в течение 15 мин и отмывали раствором Рингера (8,5 г NaCl, 0,25 г NaHCO<sub>3</sub> и 0,3 г CaCl<sub>2</sub> на 1 л H<sub>2</sub>O, pH 7.0—7.2). Культуры крысиных клеток гепатомы НТС, миогенных клеток L8 и L6J1 получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург); клетки выращивали в среде DMEM с добавлением 10 % сыворотки плода коровы (СПК). Процесс дифференцировки миогенных клеток начинали с их культивирования в среде, содержащей 1 % СПК, и продолжали в присутствии инсулина в конечной концентрации 5 мкг/мл (Mandel, Pearson, 1974).

Для получения поликлональной органоспецифической антипочечной сыворотки кроликов иммунизировали препаратом «клеточных теней» почек крысы с последующим 3-кратным истощением гомогенатом печени (Терюкова, Иванов, 1993). Исследования проводили с фракцией IgG, выделенной на CNBr-агарозе с иммобилизованным белком А, из антипочечной сыворотки после 3-й реиммунизации кролика. В качестве контроля использовали фракцию IgG, выделенную из сыворотки крови неиммунизированного (интактного) кролика. Концентрация белка во фракциях IgG составляла около 5 мг/мл.

Для определения поверхностных антигенов иммунохимическими методами культивируемые клетки снимали с пластика механическим путем без использования трипсин-версена. Поверхностные опухолеассоциированные гетероорганые антигены выявляли на живых клетках методом непрямой иммунофлуоресценции по Лежневой

(1968). Для этого 2 · 10<sup>6</sup> клеток в 0,5 мл раствора Рингера инкубировали 15 мин при 37 °С с иммуносывороткой или с сывороткой интактного кролика в разведении 1 : 10. Клетки промывали и обрабатывали ослиной иммуносывороткой против иммуноглобулинов кролика, меченной изотиоцианатом флуоресцеина.

Фракции, обогащенные плазматическими мембранами исследуемых клеток, выделяли по методу Хеффнера с соавторами (Haeffner et al., 1980). Белок во фракциях определяли по методу Марквелла с соавторами (Markwell et al., 1978). Количественная характеристика взаимодействия иммуносыворотки с антигенами фракции, обогащенной плазматическими мембранами клеток, получена методом ИФА, как описано ранее (Терюкова и др., 1996).

Для выявления антигенов, вступающих во взаимодействие с иммуносывороткой, белки фракций плазматических мембран подвергали электрофоретическому разделению в 7%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 0,1 % додецилсульфата натрия (SDS) (Laemmli, 1970), и последующему иммуноблотингу. При определении молекулярной массы белков использовали набор маркеров следующего состава: карбангидраза — 29 кДа, овальбумин — 45, альбумин — 67, фосфорилаза b — 97,4, β-галактозидаза — 116 и миозин — 205 кДа (Sigma, США).

Выделение органоспецифических почечных антигенов, ассоциированных с плазматическими мембранами клеток гепатомы Зайдела, проводили на иммуносорбенте с использованием в качестве лиганда IgG из антипочечной сыворотки. Белки фракций, обогащенных плазматическими мембранами гепатомы Зайдела и интактных гепатоцитов, лизировали 2%-ным Тритоном X-100 в 0,010 М натрий-фосфатном буфере (ФБ), содержащем 0,15 М NaCl и 1 мМ фенолметилсульфонилфторида (pH 7,4), на льду в течение 20 мин. Солюбилизат центрифугировали при 10 000 г в течение 30 мин, концентрацию NaCl в супернатанте увеличивали до 0,5 М и соединяли с иммуносорбентом в течение ночи при 4 °С. Сорбент тщательно отмывали от несвязавшегося белка ФБ, содержащим 0,5 М NaCl и 0,5 % Тритона X-100. Белок, элюируемый с иммуносорбента 0,05%-ным диэтиламином (pH 11,5), осаждали 5%-ной трихлоруксусной кислотой, промывали ацетоном и разделяли методом SDS-электрофореза в 10%-ном ПААГ. По окончании электрофореза гель фиксировали и окрашивали серебром, как описано ранее (Терюкова и др., 2005). Белок с мол. массой порядка 43 кДа вырезали из полиакриламидного геля и обрабатывали для проведения масс-спектрометрии согласно рекомендациям Шевченко и сотрудников (Shevchenko et al., 1996). Масс-спектрометрический 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 и добавляли 0,5 мкл матрицы — циано-4-гидроксикоричной кислоты в концентрации 20 мкг/мкл. Полученные пептидные спектры обрабатывали с использованием поисковой базы SWISSPROT.

## Результаты и обсуждение

Проведено сравнительное изучение экспрессии органоспецифических почечных антигенов на поверхностях как низкодифференцированных, активно пролиферирующих клеток гепатом и высокодифференцированных интактных гепатоцитов крысы, так и культивируемых мио-

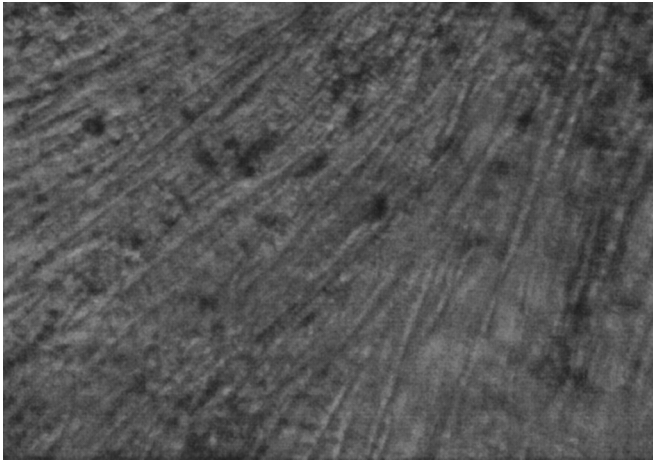


Рис. 1. Миотубы дифференцированных миогенных клеток L6J1.

бластоподобных миогенных клеток (L8 и L6J1) и дифференцированных клеток L6J1 (результаты получены для ИФА и иммуноблотинга). Обе клеточные линии происходят от клеток скелетных мышц, но сублиния L6J1 трансформирована метилхолантеном. Как показано на рис. 1, дифференцировка клеток L6J1 в присутствии 1 % СПК и инсулина приводит к образованию крупных многоядерных веретенообразных миотуб.

На рис. 2 представлены результаты тестирования исследуемых клеток крысы методом непрямой иммунофлуоресценции. Обработка клеток антипочечной сывороткой вызывает специфическое свечение «кольцевого» и «точечного» типов поверхностных молекул клеток гепатом Зайдела (рис. 2, а), НТС (рис. 2, в), миогенных клеток L8 (рис. 2, ж) и L6J1 (рис. 2, и), тогда как свечения интактных гепатоцитов не зафиксировано (рис. 2, д). Также отсутствует свечение клеток, обработанных сывороткой неиммунизированного кролика (рис. 2, б, з, е, з, к).

Количественная характеристика взаимодействия антипочечной сыворотки с фракциями, обогащенными плазматическими мембранами исследуемых клеток, получена методом ИФА (рис. 3). Видно, что антипочечная сыворотка обладает большим сродством к антигенам миогенных клеток L8 (рис. 3, з) и меньшим — к антигенам миогенных клеток L6J1, причем как миобластоподобных (рис. 3, ж), так и дифференцированных (рис. 3, б). Примерно с таким же успехом антипочечная сыворотка связывается с препаратами гепатомы Зайдела (рис. 3, л) и НТС (рис. 3, 2) и лишь при низких разведениях иммуносыворотки — с антигенами гепатоцитов (рис. 3, 5). Следовательно, можно ожидать, что в отличие от интактных гепатоцитов дифференцированные миогенные клетки экспрессируют на клеточной поверхности антигены, свойственные дефинитивным тканям почек. К такому же выводу можно прийти при анализе результатов тестирования мышечных антигенов, выполненного ранее: взаимодействие иммуносыворотки с антигенами «клеточных теней» мышц находится примерно на том же уровне или превышает связывание с антигенами клеток гепатомы Зайдела, что может указывать на присутствие общих антигенов в составе препаратов «клеточных теней» мышц и фракции, обогащенной плазматическими мембранами клеток гепатомы Зайдела (Терюкова и др., 1996).

Для выявления антигенов, реагирующих с антипочечной сывороткой, белки фракций плазматических мембран

исследуемых клеток разделяли методом SDS-электрофореза в 7%-ном ПААГ с последующим иммуноблотингом. На рис. 4, а, б видно, что в образцах гепатомы Зайдела и НТС антипочечная сыворотка интенсивно окрашивает компонент с мол. массой около 200—205 кДа и слабее — 180 кДа. Методом масс-спектрометрии Тюрёва с соавторами (2004) идентифицировали компонент 200—205 кДа как  $\alpha 4$ -,  $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -цепи ламинина-8/9, а полосу с мол. мас-

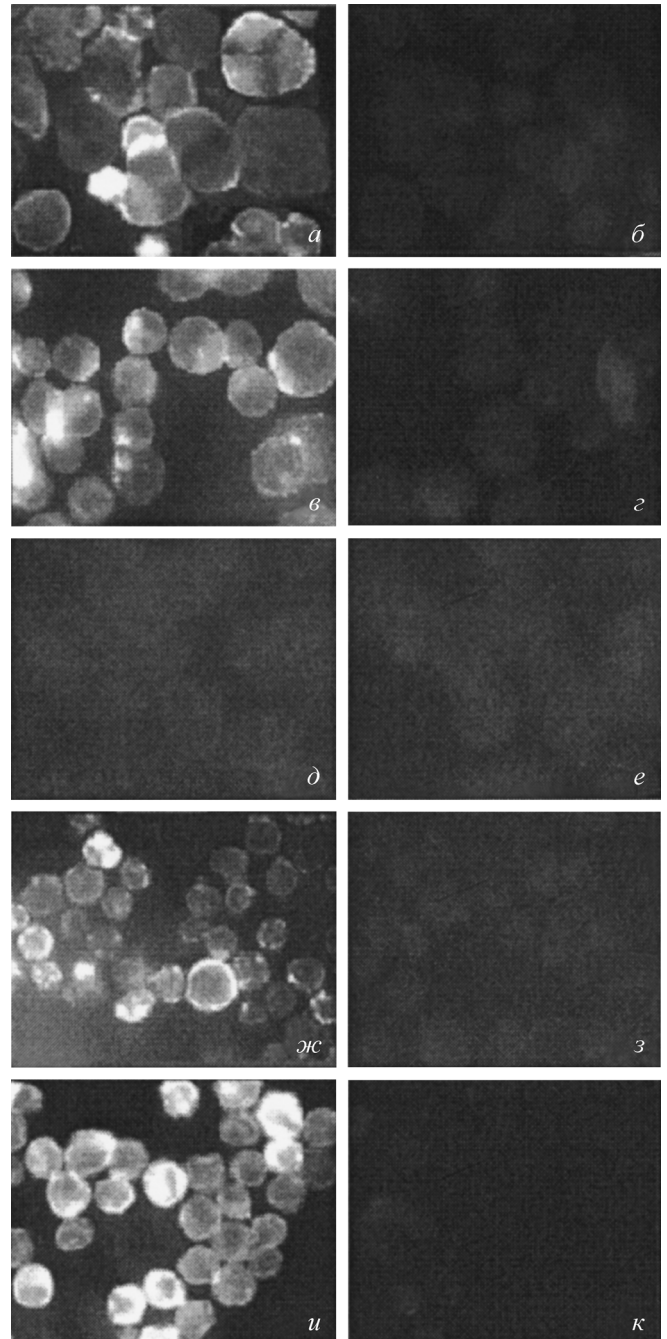


Рис. 2. Выявление органоспецифических почечных антигенов на поверхности живых клеток методом непрямой иммунофлуоресценции.

Специфическое свечение клеток асцитной гепатомы Зайдела (а) и культивируемой гепатомы НТС (в), миогенных клеток L8 (ж) и L6J1 (и), обработанных антипочечной сывороткой; свечение интактных гепатоцитов (д) и клеток, обработанных сывороткой неиммунизированного кролика (б, з, е, з, к), не зарегистрировано.

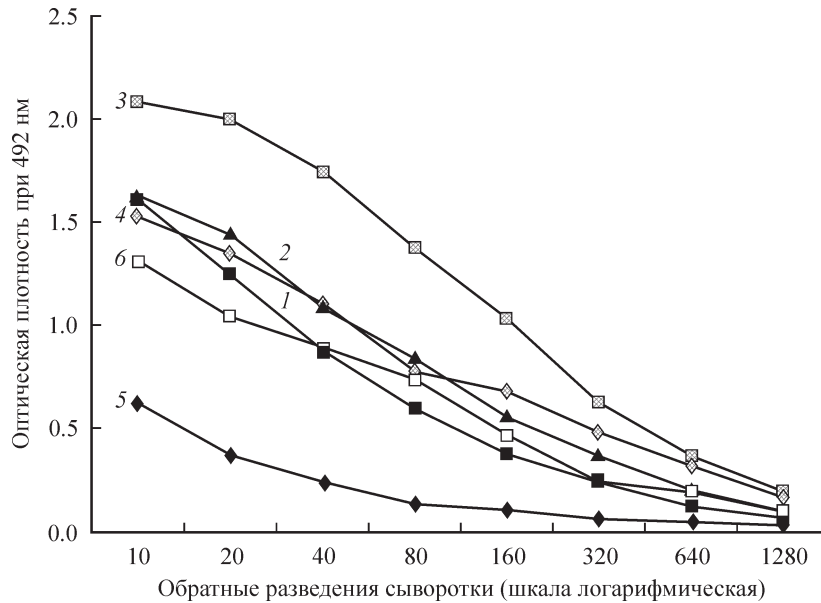


Рис. 3. Определение связывания органоспецифической антипочечной сыворотки с антигенами фракций, обогащенных плазматическими мембранами гепатом Зайдела (1) и НТС (2), миобластов миогенных клеток L8 (3) и L6J1 (4), миотуб дифференцированных клеток L6J1 (6), а также интактных гепатоцитов (5) методом иммуноферментного анализа.

сой около 180 кДа — как  $\gamma 1$ -цепь ламинина, из чего следует, что антипочечная сыворотка содержит антитела к  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ - и  $\gamma 1$ -цепям ламинина. В составе интактных гепатоцитов (рис. 4, в) этот компонент не определяется, что хорошо согласуется с литературными данными. Действительно, гепатоциты нормальной взрослой печени секретируют фибронектин и не синтезируют ламинин (Stamatoglou et al., 1991; Couvelard et al., 1998), тогда как уже в первичной культуре гепатоциты наряду с фибронектином и коллагеном начинают секретировать ламинин (Clement et al., 1988; Rescan et al., 1991). В экспериментах на крысах показано, что после трехкратного введения животным гепатоканцерогена диэтилнитрозамина (ДЭНА) на фоне частичной гепатэктомии ламинин обнаруживается в неопластических узлах и вокруг псевдоацинарных структур (Rescan et al., 1990). Кроме того, установлен синтез ламинина в клеточных линиях гепатом крысы (Faza 967 и НТС) и человека (НерG2 и НВGC2). Важно подчеркнуть, что дискретные отложения ламинина видны в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов, т. е. при определенных условиях именно сами гепатоциты способны синтезировать ламинин, причем речь идет о выявлении преимущественно  $\beta$ -цепи ламинина и в меньшей степени  $\gamma$ -цепи, тогда как синтеза  $\alpha$ -цепи гепатоцитами крысы авторы не обнаружили. Позднее были идентифицированы изоформы ламинина, синтезируемые клетками гепатокарциномы (ГК) человека как ламинин-2/4 ( $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\gamma 1$ ) (Lietard et al., 1998). Также установлен синтез клетками ГК человека ламинина-5 ( $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  и  $\gamma 2$ ), причем  $\gamma 2$ -цепь экспрессируется только метастазирующими опухолями (Giannelli et al., 2003), т. е. можно предположить, что по мере опухолевой прогрессии с увеличением инвазивности и подвижности клеток, их метастатического потенциала меняется изоформа синтезируемого клетками ламинина. Отметим также, что ламинин-5 (и прежде всего его  $\gamma 2$ -цепь) признан в качестве биомаркера гепатокарцином человека и имеет в медицинской практике диагностическое и прогностическое значение (Qin, Tang, 2004). Таким образом, по-видимому, в отношении ламинина нельзя не согла-

ситься с тем, «что антигенная дивергенция, осуществляемая за счет гетероорганных антигенов, является не только или, точнее, не столько следствием энергичной пролиферации клеток, сколько результатом влияния других факторов, среди которых нельзя не упомянуть о снижении компетенции клеток к регулирующим стимулам...» (Фель, 1990).

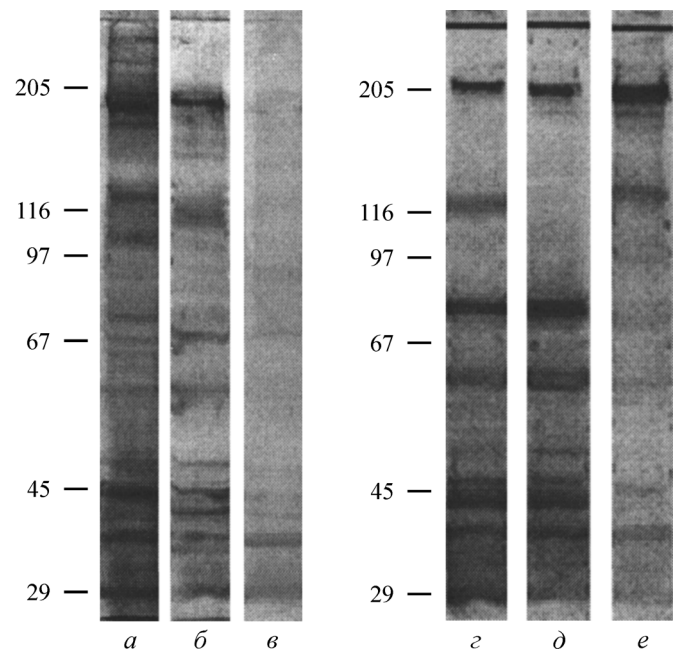


Рис. 4. Выявление органоспецифических почечных антигенов методом иммуноблоттинга.

Белки фракций, обогащенных плазматическими мембранами гепатом Зайдела (а) и НТС (б), интактных гепатоцитов (в), миобластов миогенных клеток L8 (г) и L6J1 (д), миотуб дифференцированных миогенных клеток L6J1 (е), разделяли электрофоретически в 7%-ном ПААГ и после переноса на нитроцеллюлозу обрабатывали антипочечной сывороткой. Числа слева — молекулярные массы маркерных белков, кДа.

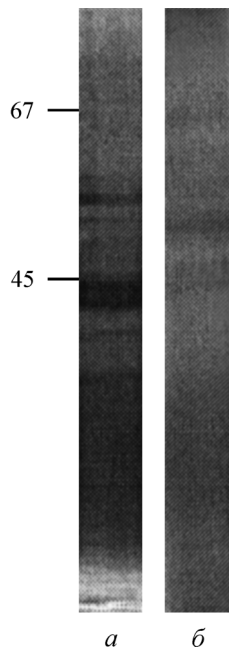


Рис. 5. Выделение опухолеассоциированного гетероорганного антигена с мол. массой около 43 кДа из лизата фракции плазматических мембран клеток асцитной гепатомы Зайдела методом аффинной хроматографии и SDS-электрофореза (а).

В лизате соответствующей фракции интактных гепатоцитов этот белок обнаруживается в небольшом количестве (б). Числа слева — молекулярные массы маркерных белков, кДа.

Наряду с ламинином антипочечная сыворотка выявляет в составе гепатомных клеток еще ряд компонентов, отсутствующих в составе интактных гепатоцитов, которые могут рассматриваться в качестве опухолеассоциированных антигенов. Прежде всего речь идет о связывании антипочечной сыворотки с белками клеток гепатомы НТС с мол. массой около 116 кДа и клеток гепатомы Зайдела с мол. массами 105—110 и 125—130 кДа, которые в отдельных экспериментах сливаются в одну широкую полосу 110—125 кДа. Кроме того, в образцах клеток гепатомы Зайдела стабильно определяются компонент с мол. массой 75—80 кДа, отсутствующий в клетках интактных гепатоцитов и гепатомы НТС, и белок с мол. массой около 43 кДа, который в меньших количествах обнаруживается в гепатоме НТС и гепатоцитах. В этой связи стоит обратить внимание на следующий момент. В своем обзоре, посвященном вопросу антигенной дивергенции опухолевых клеток, Фель (1990) особо подчеркивал количественный характер различий в содержании гетероорганного антигена в опухолевых и нормальных тканях: речь может идти не столько о появлении в опухолевых клетках некоторых антигенов негомологичных нормальных тканей, сколько об усилении их экспрессии (up-regulation), что, возможно,

мы и наблюдаем в случае антигена с мол. массой около 43 кДа.

С целью дальнейшей идентификации опухолеассоциированных гетероорганного антигена была предпринята попытка их выделения из лизатов фракций, обогащенных плазматическими мембранами гепатомы Зайдела и интактных гепатоцитов крысы, методом аффинной хроматографии на иммуносорбенте с использованием в качестве лиганда IgG, изолированных из антипочечной сыворотки. На рис. 5 представлены результаты SDS-электрофореза в 10%-ном ПААГ белков, элюируемых с иммуносорбента: из лизата фракции плазматических опухолевых клеток (рис. 5, а) выделен единственный белок с мол. массой около 43 кДа из выявленных методом иммуноблоттинга гетероорганного антигена; результаты идентификации этого белка представлены в таблице и на рис. 6. В то же время из лизата соответствующей фракции интактных гепатоцитов белки выделяются лишь в следовых количествах (рис. 6, б).

При анализе спектров триптических пептидов 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. 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 на иммуносорбенте из лизата фракции плазматических мембран клеток гепатомы Зайдела, при толерантности 0.1 Да мы обнаружили 13 общих пептидов и 43 % перекрытия по аминокислотной последовательности с  $\beta$ -актином (см. таблицу; рис. 6).

Полученный нами результат вполне согласуется с литературными данными. Показано, что рост гепатомы Морриса у крыс сопровождается существенными изменениями в содержании актина и его полимеризации (Malicka-Blaszkiewicz et al., 1995). Так, на 2-й нед роста опухоли в цитозоле клеток отмечается значительное увеличение общего актина и F-актина, за которым следует резкое снижение этих показателей. Актин из цитозоля клеток гепатомы Морриса был выделен методом аффинной хроматографии и идентифицирован с помощью моноклональных антител как  $\beta$ -актин (Nowak et al., 1999). Высокий уровень экспрессии генов  $\beta$ -актина обнаружен также в клетках крысиной гепатомы N1S1 и в гепатоцеллюлярных опухолях человека по сравнению с соседней неопухолевой тканью (Chang et al., 1998; Lau et al., 2000). Более того, единичная инъекция крысе иницирующей дозы гепатоканцерогена ДЭНА приводит к острым изменениям генной экспрессии в печени и, в частности, к значительному увеличению уровня мРНК  $\beta$ -актина (Suzuki et al.,

#### Идентификация гетероорганного антигена, ассоциированного с фракцией плазматических мембран гепатомы Зайдела, методом масс-спектрометрии

Белок	Номер по базе SWISSPROT	Наименование белка	Молекулярная масса, Да	Количество общих пептидов	Перекрытия последовательности, %
Гепатомы Зайдела	P60711	Актин, цитоплазматический 1 ( $\beta$ -актин)	41737	13	43

1	11	21	31	41	51	61	71
<u>MDDIAALVV</u> <u>DNGSGMCKAG</u> <u>FAGDDAPRAV</u> <u>FPSIVGRPRH</u> QGVMVGMGQK DSYVVGDEAQS <u>KRGILTLKYP</u> IENHIVTNWD							
81	91	101	111	121	131	141	151
DMEK <u>IWHHTF</u> <u>YNELRVAPEE</u> <u>HPVLLTEAPL</u> <u>NPKANREKMT</u> QIMFETFNTP AMYVAIQAVL SLYASGRRTG IVMDSGDGV							
161	171	181	191	201	211	221	231
HTVPIYEGYA LPHAIL <u>RLDL</u> <u>AGRDLTDYLM</u> <u>KILTERGYSF</u> <u>TTAEREIVR</u> DIKEK <u>LCYVA</u> <u>LDFOEMATA</u> <u>ASSSSLEKSY</u>							
241	251	261	271	281	291	301	311
<u>ELPDGQVIT</u> <u>GNERFRCP</u> <u>EA</u> <u>LFQPSFLGME</u> <u>SCGIHETTFN</u> <u>SIMKCDVDIR</u> <u>KDLYANTVLS</u> <u>GGTITMYPGIA</u> <u>DRMQKEITAL</u>							
321	331	341	351	361	371		
APSTMKIK <u>II</u> <u>APPERKYSVW</u> IGGSLASLS TFQQMWISKQ EYDESGPSIV HRKCF							

Рис. 6. Идентификация гетероорганного антигена, ассоциированного с фракцией плазматических мембран асцитной гепатомы Зайдела, методом MALDI масс-спектрометрии.

Перекрытие по аминокислотной последовательности между цитоплазматическим  $\beta$ -актином крысы и триптическими пептидами белка с мол. массой около 43 кДа составляет 43 % (перекрывающиеся пептиды *подчеркнуты*).

1994). Отметим также работу, выполненную на криостатных срезах с использованием сыворотки человека, содержащей гладкомышечные антитела, в том числе антитела к актину (Toh et al., 1977). Авторы показали, что сильное окрашивание контуров низкодифференцированных неопластических клеток печени и гепатоцитов в пренеопластических очагах при обработке препаратов сывороткой объясняется увеличенной экспрессией этими клетками актиноподобного контрактильного белка. Похожая ситуация, по-видимому, имеет место в нашей работе. Антипочечная сыворотка была получена на «клеточные тени» почек, которые, как известно, покрыты фиброзной капсулой, состоящей из наружного соединительнотканного слоя и внутреннего гладкомышечного. Поэтому, неудивительно, что в составе антипочечной сыворотки присутствуют гладкомышечные антитела и, в частности, поликлональные антитела к актину, вступающие с ним во взаимодействие в иммунохимических реакциях. Выявленные нами существенные различия в содержании  $\beta$ -актина во фракциях, обогащенных плазматическими мембранами асцитной гепатомы Зайдела и интактных гепатоцитов, могут быть связаны с более высоким уровнем экспрессии  $\beta$ -актина в низкодифференцированных гепатоцеллюлярных опухолях и(или) с различной организацией актинового кортекса в примембранном цитозоле малигнизированных клеток и интактных гепатоцитов.

Теперь обратимся к данным, полученным на миогенных клетках (рис. 4). Как следует из результатов иммуноблотинга, в составе фракций, обогащенных плазматическими мембранами миобластоподобных клеточных линий (рис. 4, *з, д*) и дифференцированных клеток L6J1 (рис. 4, *е*), антипочечная сыворотка окрашивает общий компонент с мол. массой порядка 200—205 кДа, который, скорее всего, содержит  $\beta 1/\beta 2$ - и  $\gamma 1$ -цепи ламинина, причем видно, что синтез ламинина миотубами (рис. 4, *е*) увеличивается. Подтверждением такой точки зрения служат литературные данные. Так, Шулер и Сорокин (1995) методом иммуноблотинга показали, что поликлональная антисыворотка к ламинину-1 ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  и  $\gamma 1$ ) окрашивает компонент с мол. массой около 200 кДа клеточных лизатов миобластов и миотуб миогенных клеточных линий, а также первичных миогенных культур мышцы, что свидетельствует об экспрессии  $\beta 1$ - и  $\gamma 1$ -цепей ламинина этими клетками (Schuler, Sorokin, 1995). Те же ламининовые цепи выявляются антисывороткой к ламинину-1 при анализе экстрактов скелетных и сердечных мышц взрослых мышей.  $\beta 1$ - и  $\gamma 1$ -цепи, секретлируемые мышечными клетками, формируют комплекс с 380 кДа  $\alpha 2$ -цепью ламинина-2, которая не выявляется антисывороткой к ламини-

ну-1. На клеточных линиях рабдомиосаркомы человека и мышинных миобластах C2C12 показано, что если ламинин-1 способствует пролиферации миобластов, их слиянию и образованию миотуб, то ламинин-2/4 способствует стабильности миотуб, предотвращая апоптоз; экспрессия ламинина-2/4 ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1/\beta 2$  и  $\gamma 1$ ) увеличивается по мере дифференцировки миогенных клеток (Vachon et al., 1996). Синтез  $\beta 1$ - и  $\gamma 1$ -цепей ламинина выявлен также для клеточной линии L6 крысиных миобластов (Kroll et al., 1994). Поскольку используемая в нашей работе антипочечная сыворотка содержит антитела к  $\beta 1/\beta 2$ - и  $\gamma 1$ -цепям ламинина, с высокой долей вероятности можно считать, что общий компонент миогенных клеток с мол. массой порядка 200—210 кДа содержит  $\beta 1/\beta 2$ - и  $\gamma 1$ -цепи ламинина. Более того, высокое сродство антипочечной сыворотки к антигенам «клеточных теней» скелетной мышцы взрослой крысы, обнаруженное нами ранее (Терюкова и др., 1996), видимо, также объясняется присутствием в препарате ламинина.

Вместе с тем следует обратить внимание на следующее. Во-первых, в спектре поверхностных антигенов миогенных клеток L8 обнаруживается антиген с мол. массой 120 кДа, который практически не определяется в трансформированных метилхолантrenom клетках L6J1 и появляется после их дифференцировки; во-вторых, в составе фракции плазматических мембран активно пролиферирующих миобластоподобных миогенных клетках L8 и L6J1 антипочечная сыворотка выявляет ряд антигенов с мол. массами порядка 38, 42, 44, 48, 62 и 78 кДа, причем в препаратах дифференцированных клеток L6J1 эти антигены либо выражены слабо, либо отсутствуют. Наличие в составе антипочечной сыворотки поликлональных антител к актину позволяет сделать вполне обоснованное заключение о том, что компонент с мол. массой 42 кДа, выявленный во фракции плазматических мембран миобластов, является актином. Посредством ряда актинсвязывающих белков актин ассоциируется с интегринами рецепторами и обнаруживается во фракциях, обогащенных плазматическими мембранами (Barmann et al., 1986; Kieffer et al., 1995). В таком случае вызывает удивление его отсутствие в миотубах. На наш взгляд, отсутствие актина в препарате дифференцированных миогенных клеток может объясняться различной организацией актина в миобластах и миотубах. Так, известно, что существуют три типа актинов —  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -актины. При этом если  $\alpha$ -актин характерен для специализированных мышечных клеток, то цитоплазматические  $\beta$ - и  $\gamma$ -актины представляют собой немускульные формы белка. В таких клетках, как фибробласты, эпителий, лейкоциты и др.,  $\beta$ - и  $\gamma$ -актины полимеризуют-

ся в микрофиламенты, которые формируют актиновый кортекс, располагающийся под плазматической мембраной и ассоциированный с ней. Показано, что культивируемые миобластоподобные миогенные клетки также синтезируют немышечный  $\beta$ -актин, который вытесняется мышечным  $\alpha$ -актином во время терминальной стадии миогенной дифференцировки, когда пролиферирующие миобласты сливаются в многоядерные миотубы (Leibovitch et al., 1984; Lohse, Arnold, 1988). В дифференцированных миотубах  $\alpha$ -актин образует миофибриллы, располагающиеся вдоль многоядерной веретенообразной клетки. Возможно, в результате такой организации актина в миотубах во фракции плазматических мембран актин отсутствует.

Таким образом, проведенное исследование позволяет сделать следующие выводы: 1) в составе фракций, обогащенных плазматическими мембранами гепатомных клеток, определены опухолеассоциированные гетероорганные антигены с мол. массами порядка 105—130, 75—80 (для клеток гепатомы Зайдела) и 43 кДа; последний идентифицирован методом масс-спектрометрии как цитоплазматический  $\beta$ -актин; 2) антипочечная сыворотка во фракциях плазматических мембран культивируемых миогенных клеток выявляет ламинин — органоспецифический антиген почек, обнаруженный ранее в спектре поверхностных антигенов клеток гепатоцеллюлярных опухолей крыс; синтез ламинина гепатомными и миогенными клетками, по-видимому, не сопряжен с пролиферативной активностью клеток; 3) существенные различия, выявленные с помощью антипочечной сыворотки в составе фракций плазматических мембран миобластов миогенных клеточных линий L8 и L6J1, а также миотуб, образовавшихся в результате дифференцировки клеток L6J1, позволяют предположить, что экспрессия антигена с мол. массой около 120 кДа сопряжена с уровнем дифференцировки миогенных клеток, а гетероорганные антигены с мол. массами 38, 42, 44, 48, 62 и 78 кДа — с пролиферативной активностью клеток. Например, возможно, что отсутствие  $\beta$ -актина во фракции плазматических мембран дифференцированных клеток L6J1 связано с иной организацией актина в миотубах, а именно с образованием миофибрилл.

Авторы выражают свою благодарность сотруднику Отдела протеомных исследований НИИ биомедицинской химии РАМН (Москва) М. В. Серебряковой за помощь в проведении масс-спектрометрии белка.

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

### Список литературы

- Иванов В. А., Фель В. Я., Оленов Ю. М. 1975. О мембранных антигенах клеток асцитной гепатомы Зайдела. Цитология. 17 (1): 24—29.
- Лежнева О. М. 1968. Выявление поверхностных антигенов на живых клетках методом флуоресцирующих антител. В кн.: Иммунохимический анализ. М.: Медицина. 189—200.
- Назаров И. В., Иванов В. А., Фель В. Я. 1989. Антигенная дивергенция в первичной культуре гепатоцитов крыс после воздействия гепатоканцерогеном N-диэтилнитрозамином. Цитология. 31 (3): 352—355.
- Терюкова Н. П., Иванов В. А. 1993. Выделение и характеристика мембранных гетероорганных антигенов почечной при-
- роды, ассоциированных с гепатомой Зайдела. Цитология. 35 (8): 59—63.
- Терюкова Н. П., Ивашкина П. А., Миргородская О. А., Иванов В. А. 2005. Выявление и идентификация опухолеассоциированного гетерооргана антигена гепатомы Зайдела в составе негистоновых белков хроматина. Цитология. 47 (12): 1048—1054.
- Терюкова Н. П., Гуряева И. И., Грандильевская А. Б., Иванов В. А. 1996. Мембранные гетероорганные антигены опухолей гепатоцеллюлярного и миогенного происхождения. Цитология. 38 (10): 1092—1097.
- Гуряева 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 крыс. Цитология. 47 (1): 150—161.
- Фель В. Я. 1990. Антигенная дивергенция опухолевых клеток, обусловленная экспрессией гетероорганных антигенов, как проявление дисдифференцировки при канцерогенезе. Цитология. 32 (5): 407—421.
- Ходосова И. А. 1988. Ферменты опухолевых клеток. Л.: Наука.
- Baldwin M. A. 2003. Protein identification by mass spectrometry. Mol. Cell Proteomics. 3: 1—9.
- Barmann M., Wadsack J., Frimmer M. 1986. A 50 kDa, actin-binding protein in plasma membrane of rat hepatocytes of rat hepatocytes and of rat liver tumors. Biochim. biophys. acta. 859: 110—116.
- Chang T. J., Juan C. C., Yin P. H., Chi C. W., Tsay H. J. 1998. Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. Oncol. Rep. 5: 469—471.
- Clement B., Rescan P. Y., Baffet G., Loreal O., Jehry D., Campion J. P., Guillouzo A. 1988. Hepatocytes may produce laminin in fibrotic liver in primary culture. Hepatology. 8: 794—803.
- Couvelard A., Bringuier A. F., Dauge M. C., Nejari M., Darai E., Benifla J. L., Feldmavv G., Henin D., Scoazec J. Y. 1998. Expression of integrins during liver organogenesis in humans. Hepatology. 27: 839—847.
- Giannelli G., Fransvea E., Bergamini C., Marinosci F., Antonaci S. 2003. Insulin stimulates myogenesis in a rat myoblast line. Clin. Cancer Res. 9: 3684—3691.
- Haeflner E. W., Kolbe K., Schroeter D., Paweletz N. 1980. Isolation of a light and a heavy membrane-fraction of the glycogen-free Ehrlich-Lette substain. Biochim. biophys. acta. 603: 36—51.
- Jensen O. N., Larsen M. R., Roepstorff P. 1998. Mass spectrometric identification and microcharacterization of proteins from electrophoretic gels: strategies and applications. Proteins. 2 (Suppl.): 74—89.
- Kieffer J. D., Plopper G., Ingber D. E., Hartwig J. H., Kupper T. S. 1995. Direct binding of F actin to the cytoplasmic domain of the alpha 2 integrin chain *in vitro*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 217: 466—474.
- Kroll T. G., Peters B. P., Hustad C. M., Jones P. A., Killen P. D., Ruddon R. W. 1994. Expression of laminin chains during myogenic differentiation. J. Biol. Chem. 269: 9270—9277.
- Lau W. Y., Lai P. B., Leung M. F., Leung B. C., Wong N., Chen G., Leung T. W., Liew C. T. 2000. Differential gene expression of hepatocellular carcinoma using cDNA microarray analysis. Oncol. Res. 12: 59—69.
- Leibovitch S. A., Leibovitch M. P., Hillion J., Kruh J., Harel J. 1984. Alpha actin gene exist in an active structural configuration in the proliferating myoblasts as well as in differentiated myotubes of the L6 line. Biochem. Biophys. Res. Commun. 119: 630—639.
- Lietard J., Loreal O., Theret N., Campion J. P., L'Helgoual'h A., Turlin B., Ramee M. P., Yamada Y., Clement B. 1998. Laminin isoforms in non-tumoral human livers. Expression of alpha1, alpha2, beta1, beta2 and gamma1 chain mRNA and an alpha chain homologous to the alpha2 chain. J. Hepatol. 28: 691—699.
- Lohse P., Arnold H. H. 1988. The down-regulation of the chicken cytoplasmic  $\beta$  actin during myogenic differentiation does not

require the gene promoter but involves the 3'-end of the gene. Nucl. Acids Res. 16 : 2787—2803.

Malicka-Blaszkiewicz M., Styczen I., Nowak D., Hanczykowa H., Ponikowski P., Sebzda T. 1995. Actin content and polymerization in tumor, liver and serum of the hepatoma Morris 5123 tumour bearing rats. Mater. Med. Pol. 27 : 115—118.

Mandel J. L., Pearson M. L. 1974. Insulin stimulates myogenesis in a rat myoblast line. Nature. 251 : 618—620.

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.

Nowak D., Kochman A., Malicka-Blaszkiewicz M. 1999. Identification of actin from hepatoma Morris 5123 cells. Acta biochim. Pol. 46 : 949—959.

Qin L.-X., Tang Z.-Y. 2004. Recent progress in predictive biomarkers for metastatic recurrence of human hepatocellular carcinoma: a review of the literature. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 130 : 497—513.

Rescan P.-Y., Clément B., Yamada Y., Glaise D., Segui-Real B., Baffet G., 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., Clément B., Yamada Y., Segui-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.

Schuler F., Sorokin L. M. 1995. Expression of laminin isoforms in mouse myogenic cells *in vitro* and *in vivo*. J. Cell Sci. 108 : 3795—3805.

Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. Anal. Chem. 68 : 850—858.

Stamatoglou S. C., Manson M. M., Green J. A., Mayol X., Hughes R. C. 1991. Distribution of fibronectin and fibronectin-binding proteins, AGp110 and integrin alpha 5 beta 1, during chemically induced hepatocarcinogenesis in adult rats. J. Cell Sci. 100 : 599—604.

Suzuki T., Imagawa M., Yamada R., Yokoyama K., Kondo S., Itakura K., Muramatsu M. 1994. Acute changes in liver gene expression in the N-nitrosodiethylamine-treated rat. Carcinogenesis. 15 : 1759—1761.

Teryukova N. P., Blinova G. I., Tyuryaeva N. I., Ivanov V. A. 1999. Inhibitory effect of polyclonal antibodies against tumor-associated membranous heteroorganic antigen MA-50 on DNA synthesis in cultured rat cells. Exp. Oncol. 21 : 146—149.

Toh B. H., Cauchi M. N., Cook P. C., Muller H. K. 1977. Increased expression of actin-like contractile protein in preneoplastic and neoplastic lesions in rat liver. Br. J. Cancer. 35 : 761—767.

Vachon P. H., Loechel F., Xu H., Wewer U. M., Engvall E. 1996. Merosin and laminin in myogenesis; specific requirement for merosin in myotube stability and survival. J. Cell Biol. 134 : 1483—1497.

Поступила 12 XII 2006

#### COMPARATIVE INVESTIGATION OF ANTIGENS ASSOCIATED WITH PLASMATIC MEMBRANES OF RAT HEPATOMA AND MYOGENIC CELLS USING ANTI-KIDNEY SERUM

N. P. Teryukova, A. S. Desheva, G. I. Blinova, O. A. Mirgorodskaya, V. A. Ivanov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;  
e-mail: iva@mail.cytspb.rssi.ru

The investigation of antigenic diversion of tumor cells resulting from the expression of heteroorganic antigens has been continued. Tumor-associated heteroorganic antigens with mol. weight 200—210 kDa (identified before as laminin), 105—130, 75—80 and 43 kDa were detected by anti-kidney serum in fractions of plasmatic membranes of cells of rat ascitic Zajdela hepatoma and cultured HTC hepatoma; the antigen 43 kDa was isolated on immunosorbent and identified by mass spectrometry as  $\beta$ -actin. Anti-kidney serum revealed laminin in fractions of plasmatic membranes of cultured L8 and L6J1 myoblasts, and L6J1 myotubes; apparently, synthesis of laminin by hepatoma and myogenic cells is not connected with their proliferative activity. Besides, anti-kidney serum detected components 38, 42, 44, 48, 62, 78 and 120 kDa, expression of which on myogenic cells surface might be consequence of active cell proliferation and (or) differentiation.

Key words:  $\beta$ -actin, antigenic diversion, hepatoma, laminin, mass-spectrometry, myogenic cells, tumor-associated antigens.