

РАСПОЗНАВАНИЕ И ЛИЗИС ЕСТЕСТВЕННЫМИ КИЛЛЕРАМИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ УЧАСТИИ ЛАМИНИНА

© Н. А. Филатова,¹ И. И. Тюряева, В. А. Иванов

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ¹ электронный адрес: tda@peterlink.ru

Согласно полученным в настоящей работе данным, в состав рецепторного комплекса естественных киллеров (ЕК) мышей входит ламинин, антитела к которому блокируют ЕК-активность (ЕКА) независимо от присутствия комплемента. Преинкубация спленоцитов мышей с антиламининовой сывороткой приводила к снижению ЕКА спленоцитов в отношении опухолевых клеток-мишеней (КМ), причем в отношении культивируемых клеток гепатомы крысы НТС наблюдалось двукратное снижение ЕКА, а в отношении культивируемых клеток эритробластоидного человека К562 — в 10 раз. Предобработка спленоцитов нормальной неиммунной сывороткой не приводила к изменению ЕКА. Совсем иную картину наблюдали при преинкубации опухолевых клеток с антиламининовой сывороткой: предобработка КМ К562 приводила к двукратному уменьшению чувствительности этих клеток к ЕК-лизису, а предобработка КМ НТС, наоборот, делала их более чувствительными (в 2 раза) к ЕК-лизису. Электрофоретическое разделение белков плазматических мембран КМ с последующим иммуноблоттингом с антиламининовой иммуносывороткой обнаружили присутствие ламинина на плазматических мембранах клеток НТС, идентифицированного методом масс-спектрометрии как ламинин-8/9, тогда как на клетках К562 ламинин выявлено не было. Преинкубация спленоцитов с ламинином не приводила к изменению ЕКА в отношении КМ К562 и НТС. Предобработка ламинином КМ К562 и НТС снижала ЕКА до нуля. Полученные данные позволяют говорить о несомненном участии ламинина и рецепторов к нему в цитоллизе КМ посредством ЕК.

Ключевые слова: естественные киллеры, канцерогенез, спленоциты, ламинин, рецепторы к ламинину.

Принятые сокращения: ЕК — естественные киллеры, ЕКА — активность естественных киллеров, КМ — клетки-мишени, КЭ — клетки-эффекторы.

В последние годы опубликовано большое количество работ о природе структур на поверхности опухолевых клеток, распознаваемых клетками иммунной системы, в частности естественными киллерами (ЕК) (Takeda, Okumura, 2004; Lanier, 2005). ЕК играют роль первой линии защиты организма от опухолевых, инфицированных вирусами и других абберантных клеток, не нуждаясь при этом в какой-либо сенсibilизации. Однако до сих пор остается недостаточно исследованным вопрос о строении распознающего рецептора ЕК. Одним из возможных компонентов, входящих в состав этого рецептора, является ламинин — гликопротеин внеклеточного матрикса, тесно ассоциированный с плазматическими мембранами клеток посредством молекул адгезии — интегриновых рецепторов и других ламининсвязывающих белков. С другой стороны, «опухолевый» ламинин и его углеводные компоненты в особенности могут оказаться той структурой, которая распознается ЕК на клетках-мишенях (КМ) (Laubourgn, 1989; Манских, 2006).

Ранее нами было показано, что клетки гепатомы Зайдела крысы синтезируют ламинин, который локализуется на внешней мембране гепатомных клеток и может быть выявлен как опухолеассоциированный антиген (Тюряева и др., 2005а). Ламинин играет значительную роль в пролиферации гепатоцитов, становлении архитектуры печени и ее васкуляризации. Отличительной особенностью здоро-

вой взрослой печени является отсутствие базальных мембран и соответственно ламинина между белками гепатоцитов и капиллярами (синусоидами) печени, что диктуется необходимостью в быстром двунаправленном обмене макромолекул между плазмой и гепатоцитами (Martinez-Hernandez, Amenta, 1993, 1995). Однако при пролиферативных процессах в печени в период эмбрионального, раннего постэмбрионального развития и при репаративных событиях ламинин обнаруживается (Kato et al., 1992; Wever et al., 1992; Martinez-Hernandez, Amenta, 1995; Amenta, Harrison, 1998). Гепатоканцерогенез также ассоциируется с синтезом ламинина, который находят как в пре-неопластических узелках, так и в уже сформировавшихся гепатоцеллюлярных опухолях (Albrechtsen et al., 1988; Rescan et al., 1990). Таким образом, по-видимому, обеспечивается микроокружение, необходимое клеткам для пролиферации и, возможно, выполнения других функций, связанных с их жизнедеятельностью. Несомненный интерес представляет функциональное значение появления ламинина как опухолеассоциированного антигена на поверхности опухолевых клеток гепатоцеллюлярного происхождения при отсутствии его в нормальных интактных гепатоцитах и являющегося органоспецифическим для почек крыс (Тюряева и др., 2005б).

Поэтому целью настоящей работы было выяснение участия ламинина и рецепторов к нему в распознавании

и лизисе ЕК гепатомных клеток крысы. Объектами исследования были выбраны две клеточные линии, одна из которых (гепатома НТС крысы) имела на поверхности клеток ламинин, а другая (K562) — нет.

Материал и методика

Опыты проводили на мышцах линии СЗНА (питомник «Рапшолово» РАМН). Клеточные культуры гепатомы НТС крысы и K562 человека получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН).

Антиламининовую иммуносыворотку получали путем иммунизации кроликов препаратом ламинина-1 (любезно предоставленным проф. Г. П. Пинаевым, Институт цитологии РАН). Ламинин-1 был выделен из Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) саркомы мыши (Palm, Furcht, 1983) и введен кроликам в смеси с адьювантом Фрейнда. Фракцию иммуноглобулинов G из полученной иммуносыворотки выделяли методом аффинной хроматографии на колонке белок А-агароза (Иванов, 1982; Терюкова, Иванов, 1993). В качестве контрольной таким же образом была очищена фракция IgG из нормальной сыворотки интактного кролика. В дальнейшем все полученные препараты антител (фракции IgG) будем называть иммуносыворотками.

Фракцию плазматических мембран клеток гепатомы Зайдела и гепатоцитов крыс получали по методу Хеффнера с сотрудниками (Haeffner et al., 1980). Концентрацию мембранно-связанного белка и белка в растворе детергента определяли по методу Марквелла с сотрудниками (Markwell et al., 1978).

Белки плазматических мембран были подвергнуты электрофорезу в 5%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (Laemmli, 1970). В качестве маркеров молекулярной массы использовали набор маркеров (Sigma, США): миозин кролика — 205 кДа, β -галактозу *E. coli* — 116, фосфоорилазу b — 97.4, сывороточный бычий альбумин — 66, овалбумин — 45, и карбоангидразу — 29 кДа.

После окончания фореа гель переносили на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0.45 мкм (Amersham, Швеция) и осуществляли перенос белков в течение 2 ч при напряжении 100—300 В и силе тока 500 мА. Для визуализации белковых полос нитроцеллюлозную мембрану окрашивали Понсо С. Места неспецифического связывания белков нитроцеллюлозой блокировали 3%-ным сухим молоком на 20 мМ Трис-буфере со 150 мМ NaCl, pH 7. Далее мембрану инкубировали с иммуносывороткой, в качестве вторых антител использовали козы антигена против кроличьих IgG, конъюгированные со щелочной фосфатазой (Sigma, США).

Белковые полосы, разделенные в 5%-ном ПААГ, были визуализированы окрашиванием Coomassie Brilliant Blue R250, вырезаны из геля и подготовлены для масс-спектрометрического анализа (Shevchenko et al., 1996), который проводили на масс-спектрометре MALDI TOF Bruker reflex IV в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Полученные пептидные спектры обрабатывали с использованием поисковой базы SwissPROT (<http://prospector.ucsf.edu>).

Клетки-эффекторы (КЭ) получали из селезенки интактных мышей. Для приготовления суспензии спленоцитов селезенку тщательно измельчали ножницами, а затем суспендировали в среде Игла, пропуская через иглы

уменьшающегося диаметра. Полученную суспензию фильтровали через 2 слоя марли и центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Эритроциты из осадка клеток удаляли с помощью гипотонического шока. Для этого осадок ресуспендировали в 1.8 мл дистиллированной воды, через 20 с добавляли 0.2 мл 10-кратного раствора Хенкса и 1.8 мл среды Игла для выравнивания осмотичности раствора. Затем опять фильтровали через 2 слоя марли и суспензию спленоцитов осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин. Полученный осадок спленоцитов ресуспендировали в так называемой полной среде, содержащей RPMI-1640, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, инактивированной нагреванием, 20 мМ HEPES, pH 7.3, 80 мкг/мл гентамицина и 5 мкг/мл РНКазы. Подсчет спленоцитов в исследуемой суспензии проводили в камере Горяева.

В цитотоксическом тесте в качестве клеток-мишеней (КМ) использовали культивируемые клеточные линии эритробластога человека K562 и гепатомы НТС крысы. В некоторых случаях КЭ или КМ преинкубировали с ламинином (30 мкг ламинина на $5 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл среды) в течение 30 мин при 37 °С. Затем клетки дважды отмывали от ламинина и использовали в цитотоксическом тесте. Предобработку КМ и КЭ антиламининовой или нормальной сывороткой кролика проводили в течение 30 мин в конечном разведении 1 : 200. Затем, как и в случае с ламинином, клетки отмывали от сыворотки перед проведением дальнейших исследований.

Для определения естественной киллерной активности спленоцитов использовали ^3H -уридиновый цитотоксический тест (Hashimoto, Sudo, 1971) в модификации Рыковой с соавторами (1981). КМ метили ^3H -уридином (удельная активность $999 \cdot 10^6$ Бк/моль). Во флакон, содержащий $(2-3) \cdot 10^6$ клеток, добавляли $2 \cdot 10^5$ Бк изотопа и инкубировали при 37 °С в течение 2 ч. Затем клетки отмывали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин в среде Игла и ресуспендировали в полной среде. После 2-часовой инкубации в среде без изотопа клетки вновь отмывали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин в среде Игла, ресуспендировали в полной среде, подсчитывали в камере Горяева и разводили до нужной концентрации.

Каждый вариант опыта выполняли в 3—6 повторностях в пластиновых 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических реакций. В каждую лунку вносили по 0.1 мл суспензии КЭ ($0.2 \cdot 10^6$ клеток) и по 0.1 мл суспензии меченых клеток K562 или НТС (10^4 клеток), т. е. соотношение эффекторов и мишеней составляло 20 : 1. В контрольные пробы вместо спленоцитов вносили по 0.1 мл полной среды. Инкубацию проб проводили в течение 18 ч при 37 °С в атмосфере с 5 % CO_2 .

После инкубации содержимое лунок переносили на бумажные фильтры, промывали последовательно физиологическим раствором, 5%-ной ТХУ, 96%-ным этанолом и высушивали. Радиоактивность измеряли в сцинтилляционном счетчике LS8100 (Beckman). Уровень естественной киллерной активности оценивали с помощью цитотоксического индекса (ЦИ), отражающего долю погибших клеток в процентах.

Результаты

Для изучения роли мембранно-связанного ламинина, ассоциированного с гепатоцеллюлярными опухолями, была получена специфическая иммуносыворотка путем

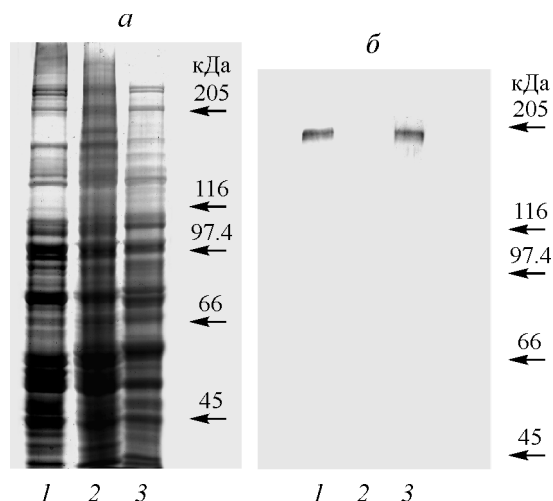


Рис. 1. Электрофоретическое разделение мембранных белков клеток гепатомы Зайдела, K562 и гепатомы НТС (а) и выявление на иммуноблоте субъединиц ламинина (б).

Дорожки: 1 — гепатома Зайдела, 2 — K562, 3 — гепатома НТС.

иммунизации кроликов препаратами ламинина-1, охарактеризованная нами ранее (Тюреева и др., 2005а). Полученные антитела реагировали с субъединицами ламинина-1, а в составе плазматических мембран гепатомы Зайдела обнаруживали взаимодействие с белковой полосой на уровне 200 кДа, соответствующей субъединицам ламинина (Тюреева и др., 2005б).

Для того чтобы выяснить участие ламинина, ассоциированного с клетками гепатоцеллюлярных опухолей, с одной стороны, и рецепторов к нему у ЕК для распознавания и лизиса опухолевых клеток — с другой, необходимо было перейти от перевиваемой опухоли Зайдела к клеточной культуре, поскольку анализ цитотоксической активности с использованием ^3H -уридина (Hashimoto, Sudo, 1971) на модели перевиваемых и спонтанных опухолей невозможен (клетки таких опухолей почти не включают изотопную метку ^3H -уридин). Для изучения была выбрана клеточная культура другой гепатомы крысы — гепатомы НТС. В качестве клеток, не несущих, судя по литературным данным, на своей поверхности ламинина, тестировали культивируемые клетки эритробластоза человека K562.

Среди белков плазматических мембран клеток гепатомы НТС крысы после их электрофоретического разделения и последующего иммуноблотинга антиламининовая сыворотка, так же как и при исследовании мембранных белков клеток гепатомы Зайдела (Тюреева и др., 2005а), дала иммунологическую реакцию с мембранными компонентами, расположенными в районе мол. массы 200 кДа (рис. 1). В то же время реакции антиламининовой сыворотки с препаратом мембранных белков клеток K562 не обнаружили, что подтверждает отсутствие ламинина на поверхности этих клеток.

Для подтверждения данных иммуноблотинга и сравнительного анализа белковых полос в районе фракций 200 кДа плазматических мембран клеток гепатомы Зайдела и гепатомы НТС был использован метод масс-спектрометрии. Примеры полученных MALDI-TOF масс-спектров представлены на рис. 2.

Спектры молекулярных масс (MH^+) пептидов изучаемого опухолеассоциированного мембранного компонента

гепатомы НТС и гепатомы Зайдела очень схожи, из чего можно заключить, что клетки гепатоцитов характеризуются появлением на своей поверхности (по сравнению с гепатоцитами крысы) одного и того же белка.

Массы пептидов были использованы для идентификации белков в поисковой базе данных SwissPROT. Анализ результатов позволил сделать вывод о том, что, как и в образце мембранных белков в районе 200 кДа клеток гепатомы Зайдела, аналогичный компонент гепатомы НТС содержит пептиды $\alpha 4$ -, $\beta 1$ -, $\beta 2$ - и $\gamma 1$ -цепей ламинина (табл. 1).

Надо отметить, что, несмотря на высокую межвидовую гомологию цепей ламинина, существуют пептиды, характерные именно для данного вида животного. Так, сравнение масс-спектров триптических фрагментов $\beta 2$ -цепи ламинина мыши и крысы обнаружило некоторые различия. Например, пептиды с мол. массами (MH^+) 968.49, 1001.53 и 1184.59 принадлежат $\beta 2$ -цепи ламинина мыши, но не крысы, а пептиды с мол. массами (MH^+) 974.51, 1063.48 и 1456.64 принадлежат $\beta 2$ -цепи ламинина только крысы. Поэтому ряд неидентифицированных пептидов может принадлежать соответствующим субъединицам ламинина не мыши, а крысы, масс-спектроскопические данные для которой отсутствуют в базах данных. Таким образом, несмотря на то что эти две гепатоцеллюлярные опухоли индуцированы разными канцерогенами и по-разному культивируются, клетки обеих опухолей синтезируют один и тот же мембранный антиген — ламинина-8/9.

Полученные результаты тестирования клеточных линий НТС и K562 позволили выбрать их объектами для выяснения участия ламинина и рецепторов к нему в распознавании и лизисе ЕК-клетками опухолевых КМ. Исследование проводили с использованием цитотоксического теста (Hashimoto, Sudo, 1971) с помощью антиламининовой иммуносыворотки и эндогенного ламинина-1. Инкубация спленоцитов с антиламининовой иммуносывороткой приводила к существенному снижению их активности: в отношении клеток НТС в 2.4 раза, а клеток K562 — в 12.7 раза, в то время как предобработка спленоцитов нормальной сывороткой кролика не влияла на их активность в отношении обеих клеточных линий (табл. 2).

Совсем иную картину наблюдали после инкубации опухолевых КМ с антиламининовой иммуносывороткой. Предобработка клеток K562 антителами приводила к уменьшению чувствительности этих клеток к ЕК-лизису в 2.4 раза. Предобработка клеток НТС, напротив, делала их более чувствительными и ЕКА спленоцитов увеличивалось в 2.4 раза. Инкубирование опухолевых клеток с нормальной сывороткой кролика не приводила к изменению их чувствительности к ЕК-лизису (табл. 2).

Участие рецепторов к ламинину в распознавании и лизисе опухолевых клеток определяли с помощью блокирования детерминант данных рецепторов ламинином. Предобработка спленоцитов ламинином не приводила к изменению их активности в отношении как клеток K562, так и клеток НТС. Предобработка ламинином опухолевых клеток K562 и НТС снижала ЕКА спленоцитов до нуля (табл. 3).

Таким образом, возможным кандидатом в состав рецептора ЕК мышей, участвующим в распознавании опухолевых клеток, является, по-видимому, ламинин, антигена к которому блокируют ЕКА вне зависимости от присутствия комплемента. На опухолевых клетках для выполнения функций ЕК важно наличие «открытых» рецепторов к ламинину, поскольку предобработка ламини-

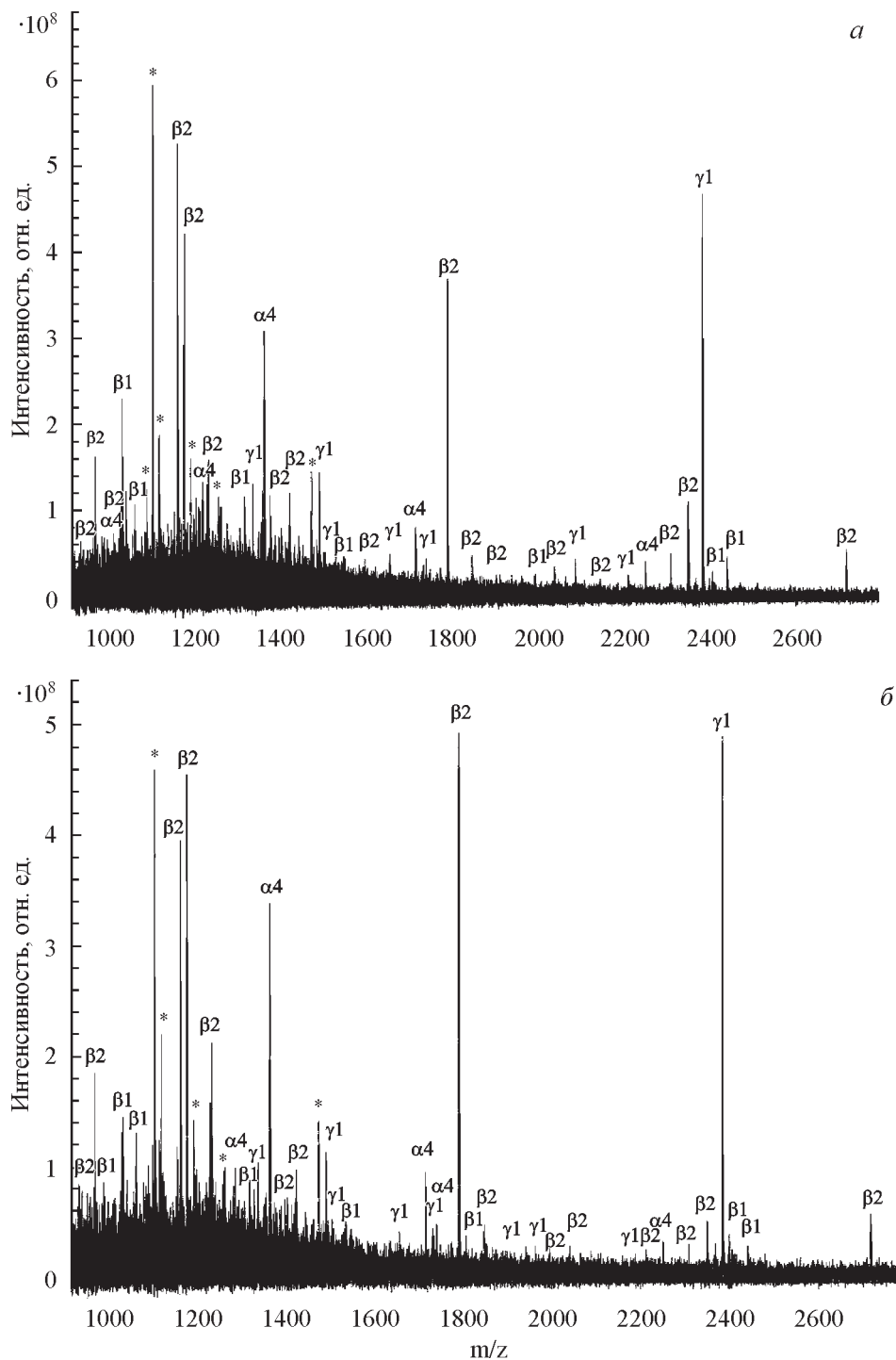


Рис. 2. Масс-спектры продуктов трипсинолиза белковых полос, располагающихся в районе мол. массы 200 кДа, после электрофоретического разделения мембранных белков клеток гепатомы Зайдела (а) и клеток гепатомы НТС (б).

α_4 , β_1 , β_2 , γ_1 — пептиды цепей ламинина; звездочкой отмечены неидентифицированные пептиды.

ном опухолевых клеток независимо от их происхождения приводит к полной утрате последними чувствительности к лизису ЕК.

Обсуждение

Естественные киллерные клетки были открыты более 30 лет назад и интенсивно изучаются, однако до сих пор нет ясности в том, какие структуры распознаются ими на

клетках-мишенях (КМ). Наименее исследованным остается вопрос и о строении распознающего рецептора ЕК.

Ламинины — это растущее семейство гетеротримерных мультидоменных гликопротеинов, формирующих вместе с некоторыми другими гликопротеинами и протеогликанами внеклеточный матрикс — неструктурированный и структурированный (базальная мембрана). Будучи тканеспецифичным компонентом, ламинин находится в тесном взаимодействии с поверхностью клеток посредством ряда интегриновых и неинтегриновых ре-

Таблица 1

Результаты масс-спектрометрического исследования двух мембранных антигенов, ассоциированных с гепатоцеллюлярными опухолями

Название белка по SwissProt ^a	Число найденных триптических пептидов		Перекрытие последовательностей белка, %	
	гепатома Зайдела	гепатома НТС	гепатома Зайдела	гепатома НТС
Ламинин, цепь $\beta 2$ (крыса)	66	73	31	32
Ламинин, цепь $\beta 2$ (мышь)	62	71	31	31
Ламинин, цепь $\beta 1$ (мышь)	43	56	20	20
Ламинин, цепь $\alpha 4$ (мышь)	54	66	28	26
Ламинин, цепь $\gamma 1$ (мышь)	62	61	26	26

^a Поискная база SwissPROT (<http://prospector.ucsf.edu>).

цепторов. Ламинины синтезируются различными типами клеток и регулируют биологические функции клетки, такие как пролиферация, дифференцировка, адгезия и хемотаксис (Brown et al., 1994; Raghov, 1994). Некоторые функции могут быть общими для всех изоформ ламинина, но существуют и уникальные, специфичные для конкретной изоформы функции, зависящие от ткани или органа, в котором данные изоформы ламинина продуцируются (Colognato, Yurchenco, 2000; Patarroyo et al., 2002). Изоформы ламинина могут регулировать пролиферацию, выживание, экстравазальную миграцию и другие виды активности и лимфоидных клеток (Virtanen et al., 2000; Geberhiwot et al., 2001).

Наличие ламининоподобных компонентов на клеточной поверхности ЕК у мышей, крыс и человека было выявлено рядом авторов в конце 1980-х годов методом непрямой иммунофлуоресценции с использованием кроличьих антител к ламинину-1 (Hiserodt et al., 1985a; Schwarz et al., 1988; Morrone et al., 1989). ЕК-клетки используют

Таблица 2

Влияние антиламининовой иммуносыворотки на активность естественных киллеров мышей СЗНА в отношении клеток-мишеней (КМ) НТС и К562

Вариант опыта	Цитотоксический индекс, %, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	
	НТС	К562
КМ + спленоциты	23.2 \pm 3.1	29.2 \pm 2.5
КМ + спленоциты, предобработанные нормальной сывороткой	23.5 \pm 3.1	29.6 \pm 3.6
КМ + спленоциты, предобработанные антиламининовой сывороткой	9.7 \pm 3.3	2.3 \pm 1.1
КМ, предобработанные нормальной сывороткой + спленоциты	21.7 \pm 2.2	29.5 \pm 4.2
КМ, предобработанные антиламининовой сывороткой + спленоциты	56.0 \pm 3.4	12.3 \pm 3.7

Таблица 3

Влияние ламинина на активность естественных киллеров мышей СЗНА в отношении клеток НТС и К562

Вариант опыта	Цитотоксический индекс, %, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	
	НТС	К562
КМ + спленоциты	23.2 \pm 3.1	29.2 \pm 2.5
КМ + спленоциты, предобработанные ламинином	27.0 \pm 4.1	21.7 \pm 2.5
КМ, предобработанные ламинином + спленоциты	0	0

эти ламининоподобные структуры для распознавания КМ (Laybourn et al., 1986; Schwarz, Hesperodt, 1988). In vitro ламинин-1 ингибирует цитотоксичность ЕК и пролиферацию лимфоцитов селезенки и повышает миграцию последних (Geberhiwot et al., 2001). Моноклональные антитела к ламинину ингибируют цитотоксичность ЕК к опухолевой клеточной линии К562, причем взаимодействие интегрина и ламинина важно для нормального взаимодействия ЕК с КМ (Lowdell et al., 1995). Однако изоформы ламинина на поверхности ЕК остаются неизученными. Методом иммунопреципитации с помощью антител к ламинину на ЕК были выявлены компоненты с мол. массами 200 и 400 кДа, однако идентификация их не проводилась (Morrone et al., 1989). Наши данные подтверждают факты ингибирования ЕКА блокированием ламинина на поверхности этих клеток антителами. Причем наибольший эффект подавления ЕКА выражается по отношению к опухолевым клеткам, не имеющим на своей поверхности ламинина (К562), но несущих, судя по результатам экспериментов с добавлением экзогенного ламинина-1, рецепторы к ламинину и (или) ламининсвязывающие белки, которые оказываются в данной ситуации важным фактором в осуществлении элиминации таких «безламининовых» опухолевых клеток ЕК-клетками.

С другой стороны, согласно нашим данным, наличие собственного ламинина и (или) связывание экзогенного ламинина злокачественно трансформированными КМ являются препятствием для распознавания и лизиса их ЕК. «Маскирование» ламинина на клетках гепатомы НТС антителами приводит к двукратному увеличению способности ЕК лизировать их. Добавление же экзогенного опухолевого ламинина, выделенного из саркомы мышцы ЕНС, к клеткам К562 и НТС полностью блокирует ЕКА. Трудно объяснимым фактом является уменьшение чувствительности к лизису ЕК клеток К562 после обработки их антиламининовой иммуносывороткой. Ведь согласно литературным и нашим данным, ламинина на их поверхности нет. Однако на клетках К562 присутствует перлекан — протеогликан, имеющий пять доменов, гомологичных ламинину (Grassel et al., 1995).

Ранее была показана связь между присутствием на поверхности опухолевых клеток рецепторов к ламинину и их чувствительностью к лизису ЕК; блокирование данных рецепторов приводит к снижению их чувствительности к ЕК-лизису (Alino et al., 1989; Laybourn et al., 1989). Обнаружено, что опухолевые клетки, чувствительные к ЕК-лизису, связывают ламинин, индуцирующий их агрегацию. Опухолевые клеточные линии, не чувствительные к ЕК-лизису, связывают ламинин намного хуже и не агре-

гируют (Hiscrodt et al., 1988). Опухолевые клетки, чувствительные к ЕК-лизису, связывали ^{125}I -меченный ламинин зависимым от времени и концентрации способом и не связывали использованные в качестве контроля меченые фибронектин и тиреоглобулин (Hiscrodt et al., 1985b).

Таким образом, наши данные подтвердили предположение ряда исследователей о том, что распознавание КМ посредством ЕК происходит с участием ламинина на поверхности ЕК (в качестве распознающего рецептора) и рецепторов к ламинину на поверхности КМ (в качестве распознаваемой детерминанты). Однако полагают, что скорее всего ламининоподобные структуры не являются универсальными распознающими рецепторами ЕК (Schwarz, Hiscrodt, 1988). Возможно, адгезионные контакты служат для ЕК своеобразным кодом, на основании которого они различают чужеродные и трансформированные клетки. Распознавание клеток по принципу адгезионного кода позволяет объяснить врожденную толерантность иммунокомпетентных клеток неспецифического звена к клеткам собственного организма.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект 06-04-48586.

Список литературы

- Иванов В. А. 1982. Антигенные перестройки клеточных структур как следствие первичного действия химических канцерогенов. В кн.: Цитологические аспекты первичного действия химических канцерогенов. Л.: Наука. 23—58.
- Манских В. Н. 2006. Естественные киллеры — отдельный класс иммунокомпетентных клеток или совокупность функциональных субпопуляций. Иммунология. 1 : 56—57.
- Рыкова М. П., Спиранде И. В., Зедгендзе М. С., Ляхов В. В., Фукс Б. Б. 1981. Новая высокочувствительная техника тестирования нормальных киллеров. Иммунология. 1 : 88—90.
- Терюкова Н. П., Иванов В. А. 1993. Выделение и характеристика мембранных гетероорганных антигенов почечной природы, ассоциированных с гепатомой Зайдела. Цитология. 36 (8) : 59—63.
- Тюрлева И. И., Миргородская О. А., Черепанова О. А., Подольская Е. П., Новиков А. В., Ходорковский М. А., Иванов В. А. 2005а. Выявление и идентификация ламинина в составе плазматических мембран клеток асцитной гепатомы Зайдела крысы. Цитология. 47 (2) : 150—162.
- Тюрлева И. И., Миргородская О. А., Черепанова О. А., Подольская Е. П., Серебрякова М. В., Иванов В. А. 2005б. Взаимодействие ламинина с компонентами плазматических мембран клеток асцитной гепатомы Зайдела. Цитология. 47 (12) : 1039—1047.
- 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.
- Alino S. F., Unda F. S., Perez-Yazza G., Conavate M. L. 1989. Are laminin binding site on tumor cell surface involved in the indometacin-induced sensitivity to natural cytotoxic cells? Biol. Cell. 66 : 255—261.
- Amenta P. S., Harison D. 1998. Expression and potential role of the extracellular matrix in hepatic ontogenesis: a review. Microscopy Research and Technique. 39 : 372—386.
- Brown J. C., Wiedemann H., Timpl R. 1994. Protein binding and cell adhesion properties of two laminin isoforms (AmB1eB2e, AmB1sB2e) from placenta. J. Cell Sci. 107 : 329—338.
- Colognato H., Yurchenco P. D. 2000. Form and function: the laminin family of heterotrimers. Develop. Dyn. 218 : 213—234.
- Geberhiwot T., Assefa D., Kortessmaa J., Interpun S., Pedza C., Wondimu Z., Charo J., Kissling R., Virtanen I., Tryggvason K., Patarroyo M. 2001. Laminin-8 (alfa4 beta1 gamma1) is synthesized by lymphoid cells, promotes lymphocyte migration and costimulates T-cell proliferation. Amer. Cell Sci. 114 : 423—433.
- Grassel S., Cohen I. R., Murdoch A. D., Exchstetter I., Iozzo R. V. 1995. The proteoglycan perlecan is expressed in the erythroleukemia cell line K562 and is upregulated by sodium butyrate and phorbol ester. Mol. Cell. Biochem. 145 : 61—68.
- Haeflner E. W., Kolbe K., Schroeter D., Paeweletz N. 1980. Isolation of a light and a heavy membrane-fraction of the glucogen-free Ehrlich-Lette substain. Biochim. biophys. acta. 603 : 36—51.
- Hashimoto Y., Sudo E. 1971. Evaluation of cell damage in immune reactions by release of radioactivity from ^3H -uridine labeled cells. Gann. 62 : 139—145.
- Hiscrodt J. C., Laybourn K. A., Varani J. 1985a. Expression of laminin-like substance on the surface of murine natural killer (NK) lymphocytes and its role in NK recognition of tumor target cells. J. Immunol. 135 : 1484—1487.
- Hiscrodt J. C., Laybourn K. A., Varani J. 1985b. Laminin inhibits recognition of tumor target cells by murine natural killer (NK) and natural cytotoxic (NC) lymphocytes. Amer. J. Patol. 121 : 148—155.
- 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.
- Laemmler U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. 227 : 680—685.
- Lanier L. L. 2005. NK cell recognition. Annu. Rev. Immunol. 23 : 225—274.
- Laybourn K. A., Hiscrodt J. C., Abruzzo L. V., Varani J. 1986. *In vitro* and *in vivo* interaction between fibrosarcoma cells and natural killer cells. Cancer Res. 46 : 3407—3412.
- Laybourn K. A., Hiscrodt J. C., Varani J. 1989. Laminin receptor expression on murine tumor cell: correlation with sensitivity to natural cell-mediated cytotoxicity. Int. J. Cancer. 43 : 737—742.
- Lowdell M. W., Shamim F., Hamon M., Macdonald I. D., Prentice H. G. 1995. VLA-6 (CDw49f) is unimportant adhesion molecule in NK cell-mediated cytotoxicity following autologous or allogenic bone marrow transplantation. Exp. Hematol. 23 : 1530—1534.
- 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. Virchows 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.
- Morrone S., Scarpa S., Puntuneri A., Zesti R., Gismondi A., Santoni G., Piccoli M., Frati L., Modesti A., Santoni A. 1989. Laminin synthesis by NK cells and modulation of its expression by TRA (12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate). Exp. Cell Res. 182 : 543—549.
- 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.
- Patarroyo M., Tryggvason K., Virtanen I. 2002. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. Cancer Biol. 12 : 197—207.
- Raghow R. 1994. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. FASEB J. 8 : 823—831.
- 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.

Schwarz R. E., Hiserodt J. C. 1988. The expression and functional involvement of laminin-like molecule in non-MHC restricted cytotoxicity by human Leu-19+ CD3-natural killer lymphocytes. *J. Immunol.* 141 : 3318—3323.

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

Takeda K., Okumura K. 2004. CAM and NK cells. *eCAM.* 1 : 17—27.

Virtanen I., Gullberg D., Rissanen J., Kivilaakso E., Kiviluoto T., Laitinen L. A., Lehto V.-P., Ekblom P. 2000. Laminin alpha1-chain shows a restricted distribution in epithelial basement membranes of fetal and adult human tissues. *Exp. Cell Res.* 257 : 298—309.

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.

Поступила 1 VII 2007

RECOGNITION AND LYSIS BY NATURAL KILLERS OF TUMOR CELLS WITH PARTICIPATION OF LAMININ

N. A. Filatova,* I. I. Tyuryaeva, V. A. Ivanov

Institute of Cytology, St. Petersburg; * e-mail: tda@peterlink.ru

According to the data obtained in the present work, the receptor complex of mouse natural killers (NK) includes laminin, antibody to which blocks EK-activity (NKA regardless of the presence of complement. Preincubation of mouse splenocytes with anti-laminin serum led to a decrease in their NKA towards tumor cells-targets (CT), the NKA activity decreasing 2 times with respect to cultivated cells of rat hepatoma HTC, while 10 times — to cultivated cells of human erythroblastosis K562. Pretreatment of splenocytes with normal nonimmune serum did not lead to a change of NKA. Quite different was the pattern after the tumor cell preincubation with anti-laminin serum: pretreatment of CT K562 led to a twofold decrease in sensitivity of these cells to NK-lysis, whereas the pretreatment of CT K562, on the contrary, made them twice sensitive to NK-lysis. Electrophoretic separation of protein of CT plasma membranes with subsequent immunoblotting with anti-laminin immune serum revealed the presence of laminin on HTC cell plasma membrane, which was identified as laminin 8/9 by the mass-spectrometry method, while no laminin was detected on K562 cells. Preincubation of splenocytes with laminin did not affect NKA with respect to CT K562 and HTC. Pretreatment of CT K562 and HTC with laminin decreased the NKA to zero. The obtained data allow suggesting a doubtless participation of laminin and its receptors in CT cytotoxicity by NK.

Key words: natural killers, carcinogenesis, splenocytes, laminin, receptors to laminin.

Abbreviations used: NK — natural killers; NKA — natural killer activity; CT — cells-targets, CE — cells-effectors.