

ВЫЯВЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОПУХОЛЕАССОЦИРОВАННЫХ АНТИГЕНОВ В СОСТАВЕ ФРАКЦИИ, ОБОГАЩЕННОЙ ПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА

© Н. П. Терюкова,^{1,*} О. А. Миргородская,² М. В. Серебрякова,³ В. А. Иванов¹

¹ Институт цитологии РАН,

² Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург,
и ³ ФГУ Научно-исследовательский институт физико-химической медицины, Москва;
* электронный адрес: nptter@yandex.ru

С помощью опухолеспецифической кроличьей иммunoсыворотки в составе фракции, обогащенной плазматическими мембранами клеток асцитной гепатомы Зайдела крысы, выявлены и выделены на иммunoсорбенте опухолеассоциированные антигены с мол. массами около 45, 57, 80 и 130 кДа. С помощью масс-спектрометрического анализа белки идентифицированы как $\beta 1$ -субъединица интегрина, эктонуклеотидная пирофосфатаза/фосфодиэстераза 3 (E-NPP3), басигин, эпителиальная молекула клеточной адгезии (EpCAM), α -фетопротеин (AFP) и белки-шапероны — регулируемый глюкозой протеин 78 (GRP78) и протеин дисульфидизомераза (PDI) A1. Обсуждаются вопросы, касающиеся особенностей функционирования этих белков в опухолевых клетках и биологии клеток асцитной гепатомы Зайдела.

Ключевые слова: гепатома, масс-спектрометрический анализ, опухолеассоциированные антигены, опухоленинирующие клетки, эпителиальная молекула клеточной адгезии, эпителиально-мезенхимный переход.

Принятые сокращения: ГК — гепатоцеллюлярная карцинома, МП — матриксные металлопротеиназы, МС-анализ — масс-спектрометрический анализ, ПААГ — поликариламидный гель, ЭМП — эпителиально-мезенхимный переход, AFP — α -фетопротеин, E-NPP3 — эктонуклеотидная пирофосфатаза/фосфодиэстераза 3, EpCAM — эпителиальная молекула клеточной адгезии, GRP78 — регулируемый глюкозой протеин 78, МАР-киназа — митогенактивируемая протеинкиназа, PDI — протеин дисульфидизомераза.

В настоящее время становится очевидным, что гепатоцеллюлярная карцинома (ГК) является гетерогенной по своим биологическим характеристикам группой опухолей, подтипы которой характеризуются генетической гомогенностью (Laurent-Puig et al., 2001; Katoh et al., 2007). Предполагается, что существующая гетерогенность ГК является следствием активации различных сигнальных путей, таких как p53, RB1, Wnt, TGF β и Ras, в процессе канцерогенеза и(или) их происхождения от клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки, — стволовых клеток, клеток-предшественников или зрелых гепатоцитов (Lee et al., 2006).

Цель наших исследований состоит в изучении биологии опухолевых клеток, состава и особенностей функционирования белков их поверхностных мембран. Компоненты наружных мембран определяют такие качества малигнизированных клеток, как адгезивность и подвижность, инвазивность и способность к метастазированию. Процесс опухолевой прогрессии сопровождается потерей клетками ряда тканеспецифических антигенов и приобретением опухолеассоциированных антигенов, которые либо синтезируются de novo, либо отличаются повышенным уровнем синтеза по сравнению с нормальной гомологичной опухоли тканью. В медицинской практике опу-

холеассоциированные антигены могут быть использованы в качестве потенциальных маркеров или возможных мишней при разработке новых фармакологических препаратов и иммунотерапии. Этим объясняется актуальность исследований, направленных на идентификацию молекул наружных мембран опухолевых клеток и выяснение их роли в процессе клеточной малигнизации.

Для изучения различных аспектов биологии опухолей широко используются культивируемые линии трансформированных клеток и перевиваемые опухоли. В нашей лаборатории изучение феномена антигенной дивергенции при опухолевом росте проводится на клетках крысины перевиваемой асцитной гепатомы Зайдела, которые пролиферируют в виде клеточных образований (островков, или комплексов), более или менее значительных по размерам. Анализ популяции клеток асцитной гепатомы Зайдела показал, что по ряду признаков каждый островок ведет себя как однородный клон (Зайдела, 1963).

Задача предпринятого нами исследования заключается в выявлении и идентификации поверхностных опухолеассоциированных антигенов клеток асцитной гепатомы Зайдела, позволяющих охарактеризовать эту перевиваемую опухоль и ответить на вопрос о природе многоклеточных комплексов в асцитической жидкости крыс.

Материал и методика

В опытах использовали беспородных крыс-самцов массой 120—150 г (питомник «Рапполово» РАМН). Суспензию гепатоцитов из печени интактных крыс готовили в соответствии с рекомендациями Назарова с сотрудниками (1989). Клетки перевиваемой гепатомы Зайдела осаждали из асцита крысы центрифугированием при 50 г в течение 15 мин и отмывали 0.15 М NaCl или средой DMEM.

Опухолеспецифическую иммуносыворотку получали путем иммунизации кроликов фракцией, обогащенной поверхностными мембранами флотирующих многоклеточных агрегатов гепатомы Зайдела, рост которых в течение 1 мес поддерживали *in vitro* в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 10 % сыворотки крови плодов коровы и 80 мкг/мл гентамицина, в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °C. Исследования проводили с использованием фракции IgG, выделенной на CNBr-агарозе с иммобилизованным белком А из опухолеспецифической иммуносыворотки после 3-й и 4-й реиммунизаций кролика и трижды истощенной гомогенатом печени крыс. В качестве контроля использовали фракцию IgG, выделенную из сыворотки крови интактного кролика. Концентрация белка во фракциях IgG составляла около 5 мг/мл.

Фракции, обогащенные плазматическими мембранами исследуемых клеток, выделяли по методу Хеффнера с сотрудниками (Haeffner et al., 1980). Белок во фракциях определяли по методу Марквелла с сотрудниками (Markwell et al., 1978). Специфичность полученной иммуносыворотки в отношении антигенов плазматических мембран клеток асцитной гепатомы Зайдела определяли методом иммуноферментного анализа, как описано ранее (Терюкова и др., 1996).

Для выявления поверхностных опухолеассоциированных антигенов белки фракций плазматических мембран подвергали SDS-электрофорезу в 7%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) и последующему иммуноблотингу (Laemmli, 1970). Для определения мол. массы белков использовали набор маркеров следующего состава (в кДа): карбангидраза — 29, овальбумин — 45, альбумин — 67, фосфорилаза b — 97.4, β-галактозидаза — 116 и миозин — 205 (Sigma, США).

Выделение опухолеассоциированных антигенов проводили на иммunoсорбенте с использованием в качестве лиганда IgG из опухолеспецифической иммуносыворотки. Белки фракций, обогащенных плазматическими мембранами гепатомы Зайдела, лизировали 2%-ным Тритоном X-100 в 0.01 М натрий-фосфатном буферном растворе, содержащем 0.15 М NaCl и 0.001 М фенилметилсульфонилфторида (pH 7.4), на льду в течение 20 мин. Солюбилизат центрифугировали при 10 000 g в течение 30 мин, концентрацию NaCl в супернатанте увеличивали до 0.5 М и соединяли с иммunoсорбентом на 90 мин при 4 °C. Сорбент тщательно отмывали от несвязавшегося белка буферным раствором, содержащим 0.5 М NaCl и 0.5 % Тритона X-100. Белок, элюируемый с иммunoсорбента 0.05%-ным диэтиламином (pH 11.5) в присутствии детергента, осаждали трихлоруксусной кислотой при к/к 5 %, промывали ацетоном и разделяли с помощью SDS-электрофореза в 7%-ном ПААГ. По окончании электрофореза гель фиксировали и окрашивали серебром, как описано ранее (Терюкова и др., 2005). Выявленные белковые полосы вырезали из ПААГ и обрабатывали трипсином в соответствии с методическими рекомендациями, разработанными Шевченко с соавторами для проведения

масс-спектрометрии (Shevchenko et al., 1996). Масс-спектрометрический анализ (MC-анализ) выполняли на tandemном времяпролетно-времяпролетном MALDI-масс-спектрометре UltraflexII (Bruker Daltonics, Германия) в режиме положительных ионов с использованием рефлектона. Идентификацию белков проводили методом пептидного фингерпринта (peptide mass fingerprint, или «отпечатков пальцев»). Точность определения моноизотопных масс пептидов после докалибровки масс-спектров по известным пикам автолиза трипсина составляла 0.005 %. Пробы в объеме 1 мкл наносили на мишень, добавляли 0.5 мкл раствора матрицы — 2,5-дигидроксибензойной кислоты в концентрации 20 мкг/мкл в 20%-ном водном ацетонитриле с добавлением 0.5 % трифтормукусной кислоты. Фрагментацию отдельных пептидов проводили в tandemном режиме Lift, точность определения моноизотопных масс ионов составляла 0.5 Да. Поиск белков в базе данных UniProtKB (SwissProt+ TrEMBL) среди белков крыс проводили при помощи программы Mascot (matrixscience.com, США) с указанной выше точностью с допущением окисления метионинов кислородом воздуха и алкилирования цистеиновых остатков акриламидом. Совокупный поиск по спектрам триптических гидролизатов белка и спектров фрагментации отдельных пептидов был сделан с использованием программы Biotools v.3 (Bruker Daltonics, Германия).

Результаты и обсуждение

Для обнаружения в составе наружных мембран клеток асцитной гепатомы Зайдела опухолеассоциированных антигенов мы получили кроличью опухолеспецифическую иммуносыворотку против фракции, обогащенной плазматическими мембранами флотирующих многоклеточных агрегатов. По данным иммуноферментного анализа и иммуноблотинга (рис. 1, 2), после тщательного истощения гомогенатом печени полученная иммуносыворотка практически не вступает во взаимодействие с препаратом наружных мембран гепатоцитов интактных

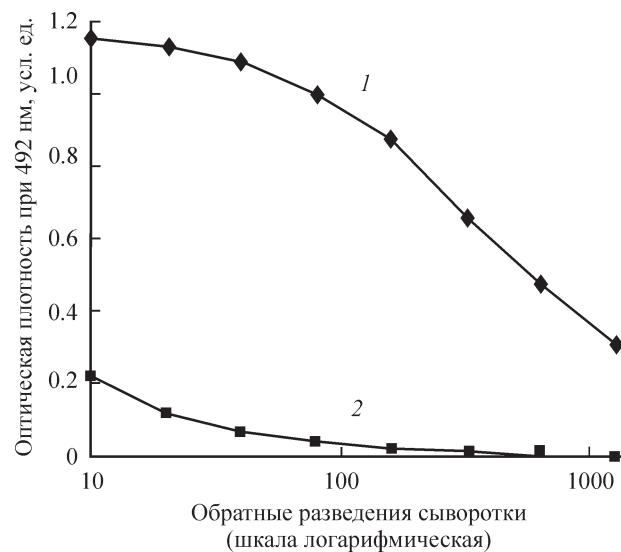


Рис. 1. Определение связывания опухолеспецифической иммуносыворотки с антигенами фракций, обогащенных плазматическими мембранами гепатомы Зайдела (1) и гепатоцитов интактных крыс (2), методом иммуноферментного анализа.

крыс. Вместе с тем иммunoсыротка специфична в отношении плазматических мембран опухолевых клеток и выявляет в их составе опухолеассоциированные антигены с мол. массами около 45, 57, 80, 130 и два высокомолекулярных антигена.

Проведено два эксперимента по выделению опухолеассоциированных антигенов на иммunoсорбенте и их МС-анализу. По результатам SDS-электрофореза в 7%-ном ПААГ мол. масса белков, элюированных с иммunoсорбентом, соответствует мол. массе опухолеассоциированных антигенов, выявленных в иммуноблоте, и составляет около 45, 57, 80 и 130 кДа (данные не показаны). Вместе с тем высокомолекулярные компоненты в элюате отсутствуют. Результаты МС-анализа вырезанных из геля белковых полос, полученные методом пептидного фингерпринта, представлены в табл. 1. Видно, что не менее 10 триптических пептидов каждого из идентифицированных нами белков совпадают по монозотопной массе с пептидами соответствующих белков из базы данных. При этом «коэффициент достоверности» идентификации выше порогового (при значении score >51 вероятность случайного совпадения $P < 0.05$). Таким образом, в каждой полоске геля с высокой степенью достоверности нами обнаружено по 1—2 протеина. Тем не менее для 3 белков дополнительно проведена МС—МС-фрагментация триптических пептидов (табл. 2), которая подтверждает правильность идентификации белков по их пептидному фингерпринту.

Идентифицированные нами опухолеассоциированные антигены представлены двумя белками-шаперонами — протеином дисульфидизомеразой A1 и регулируемым глукозой протеином 78, секреируемым гликопротеином α -фетопротеином и интегральными белками — β 1-субъединицей интегрина, басигином, эктонуклеотидной пирофосфатазой/фосфодиэстеразой 3 и эпителиальной молекулой клеточной адгезии. Стоит отметить, что, как правило, исследование протеома предполагает проведение МС-анализа белковых пятен, полученных после разделения исследуемого образца стандартным методом 2D-электрофореза. При этом редко удается идентифицировать интегральные белки клеточных мембран, изучение которых ограничено их гидрофобностью и низким содержанием в клетке (Lu et al., 2008). В последние годы для анализа интегральных белков разрабатываются и внедряются альтернативные технологии их эффективного разделения (Zhao et al., 2004; Zhang et al., 2006; Braun et al., 2007; Speers, Wu, 2007). То, что в предпринятом нами ис-

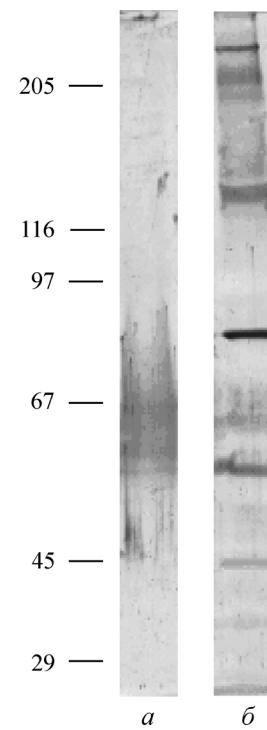


Рис. 2. Выявление опухолеассоциированных антигенов в составе наружных мембран клеток асцитной гепатомы Зайдела методом иммуноблотинга.

Белки фракций, обогащенных плазматическими мембранными гепатоцитами интактных крыс (а) и опухолевых клеток (б), разделяя методом электрофореза в 7%-ном ПААГ и после переноса на нитроцеллюлозу обрабатывали опухолеспецифической иммunoсыроткой. Числа слева — молекулярная масса маркерных белков, кДа.

следовании опухолеассоциированные антигены, предварительно выделенные на иммunoсорбенте, разделяли в ПААГ методом одномерного SDS-электрофореза, способствовало успешной идентификации некоторых интегральных белков.

Гепатоциты взрослой крысы синтезируют β 1-субъединицу интегринов, басигин, PDIA1 и E-NPP3. Поэтому появление этих белков в составе опухолеассоциированных антигенов, по всей видимости, связано с повышенным уровнем их синтеза клетками гепатомы Зайдела. Очевидно, что для подтверждения такой точки зрения необходимо проведение дополнительных исследований с

Таблица 1

Идентификация опухолеассоциированных антигенов поверхностных мембран клеток гепатомы Зайдела с помощью масс-спектрометрии

Молекулярная масса, кДа (в ПААГ)	Название белка и номер по базе UniProtKB/SwissProt	Молекулярная масса, Да	Количество совпадающих пептидов	Score («коэффициент достоверности» идентификации)
130	β 1-интегрин, P49134	92 486	11	57
	E-NPP3, P97675	101 423	13	65
80	AFP, P02773	70 615	23	187
	GRP78, P06761	72 516	17	111
57	PDIA1, P04785	57 413	10	52
	Басигин, P26453	42 977	10	70
45	EpCAM, O55159	36 037	12	70

Таблица 2

Секвенирование триптических пептидов методом tandemной масс-спектрометрии

Название белка	m/z фрагментаируемого пептида	Аминокислотная последовательность пептида
E-NPP3	1955.95	NIPQDFFTFNSEEIVR
Басигин	1052.56	GNINVEGPPR
EpCAM	1891.88	TQDDVDIADVAYYFEK
	2296.11	AQPYNFESLHTALQDTFASR

применением соответствующих антител. Вместе с тем в литературе имеются сведения об участии этих белков в опухолевой прогрессии.

Так, изменения в составе и уровнях экспрессии интегриновых рецепторов представляют собой характерные проявления нарушений дифференцировки гепатоцитов в процессе гепатоканцерогенеза и опухолевой прогрессии (Ozaki et al., 1998). Интегриновый репертуар гепатоцитов нормальной взрослой печени ограничен гетеродимерами $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ и $\alpha 9\beta 1$. Клетки ГК сохраняют синтез $\alpha 1$ -субъединиц и de novo синтезируют $\alpha 2$, $\alpha 3$ - и $\alpha 6$ -субъединицы интегринов (Volpes et al., 1993). При этом отмечается повышенный уровень экспрессии $\beta 1$ -субъединицы интегрина (Liu et al., 2002). Ламининовые интегриновые рецепторы $\alpha 6\beta 1$ через активацию MAP-киназ приводят к изменению адгезивных свойств опухолевых клеток, увеличивая их подвижность и инвазивность (Carloni et al., 2001).

Другой трансмембранный гликопротеин — басигин — также относится к молекулам клеточной адгезии. Белок синтезируется в печени крыс в умеренных количествах и экспрессируется на поверхности базолатерального домена плазматических мембран гепатоцитов (Kanekita et al., 1991). Благодаря особенностям структуры трансмембранного домена басигин формирует комплексы с некоторыми мембранными белками, в том числе с интегринами. Непосредственная ассоциация басигина с $\alpha 3\beta 1$ и $\alpha 6\beta 1$ -интегринами обнаружена в местах межклеточных контактов (Jiang, Tang, 2007). Анализ биопсийного материала, полученного от пациентов с ГК, показал, что уже на ранних стадиях заболевания опухолевые клетки интенсивно окрашиваются моноклональными антителами к басигину (Mamori et al., 2007). На клеточных линиях гепатом установлено участие басигина в процессах инвазии и метастазирования, которое заключается в индукции синтеза матриксных металлопротеиназ (МП), обеспечивающих деструкцию внеклеточного матрикса фибробластами и самими опухолевыми клетками.

Несмотря на то что основным местом локализации белков-шаперонов является эндоплазматическая сеть, гепатоциты секретируют PDIA1, который связывается с их наружной мембраной за счет электростатических связей (Terada et al., 1995). В составе наружных мембран PDI проявляет себя как редуктаза, которая восстанавливает тиоловые группы поверхностных белков и таким образом регулирует различные механизмы клеточной адгезии (Tirano et al., 2002). При печеночной патологии в крови пациентов увеличивается уровень пролил-4-гидроксилазы, структурной β -субъединицей которой является PDI, а содержание энзима в клетках ГК человека в среднем в 9.5 раза превышает норму (Bolarin et al., 1983).

Члены семейства энтоэнзимов E-NPP обнаружены практически во всех тканях, однако экспрессия отдельных изоформ ограничена определенными субструктурами и (или) клетками (Goding et al., 2003). Для некоторых форм карцином человека показана связь между малигнизацией и экспрессией E-NPP3: его повышенное содержание наблюдается в опухолевых клетках и сыворотке пациентов с карциномой желчных протоков и толстой кишки, причем в последнем случае антиген присутствует как на апикальной, так и на базолатеральной поверхности опухолевых клеток (Yano et al., 2003, 2004). В клетках печени, поджелудочной железы и тонкой кишки человека E-NPP3 отсутствует, но обнаруживается в соответствующих тканях крыс. Гепатоциты крыс, подобно другим эпителиальным клеткам, обладают полярностью и экспрессируют E-NPP3 исключительно на апикальных поверхностях, образующих желчные каналикулы (Maurice et al., 1988, 1999; Scott et al., 1997). При неопластической трансформации гепатоцитов в разной степени нарушается их полярность, так что на поверхности клеток низкодифференцированных ГК, индуцированных 3-метил-диметиламиноазобензолом, E-NPP3 не выявляется, но сохраняется в апикальных районах полярных клеток adenокарцином (Scoazec et al., 1988). Можно предположить, что обнаружение E-NPP3 в составе опухолеассоциированных антигенов клеток асцитной гепатомы Зайдела объясняется полярностью клеток, образующих островки.

В отличие от представленных выше белков основным местом локализации шаперона GPR78 является эндоплазматическая сеть, и на поверхности нормальных клеток, включая гепатоциты, GPR78 не определяется. В процессе опухолевого роста содержание GPR78 в клетках ГК увеличивается пропорционально стадии заболевания (Fu, Lee, 2003). Поверхностная локализация GPR78 показана для клеток некоторых типов опухолей (Shin et al., 2003), в том числе и для клеток гепатомы Зайдела (Тюряева и др., 2005).

К числу опухолеассоциированных антигенов, синтез которых в клетках гепатомы Зайдела осуществляется de novo, относятся AFP и EpCAM. AFP является эмбриональным белком, синтез которого в гепатоцитах взрослой печени прекращается. При злокачественной трансформации гепатоцитов в 50—70 % случаев возникновения ГК синтез белка возобновляется, благодаря чему AFP является общепризнанным маркером этого типа опухолей. Несмотря на то что AFP относится к секреторному типу белков, не все AFP-продуцирующие клеточные линии гепатом секретируют его в среду. Интересно, что клеточные линии С, D и Н гепатомы Зайдела вырабатывают этот белок, но только линия Н секретирует его в среду (Sarcione, Smalley, 1976). Показано также существование мембранны-связанных форм AFP, которые определяются на поверхности клеток и могут быть выделены из фракции плазматических мембран (Hosokawa et al., 1989). Поэтому можно предположить, что обнаруженный нами в составе фракции плазматических мембран гепатомы Зайдела белок относится к мембранны-связанной форме AFP. В отношении функций этого белка в опухолевых клетках остается много нерешенных вопросов.

Наибольший интерес с точки зрения информативности представляет EpCAM, который присутствует в составе наружных мембран клеток нормального эпителия большинства органов, но отсутствует в гепатоцитах (Schmelzer, Reid, 2008). EpCAM является трансмембранным

ным гликопротеином, опосредующим Ca^{2+} -независимую гомотипическую межклеточную адгезию (Balzar et al., 1999). Особый интерес представляет ЕрСАМ как маркер стволовых клеток (клеток-предшественников) печени и опухолеиницирующих клеток ГК. Высокий уровень экспрессии ЕрСАМ в клетках ГК наблюдается при активации Wnt- β -катенин-сигнального пути, компонентом которого он является. Известно, что Wnt- β -катенин-сигнализация играет решающую роль в эмбриогенезе и поддержании роста стволовых клеток, в развитии и регенерации печени (Yamashita et al., 2007). Изучение экспрессии ЕрСАМ клетками ГК приводит нас к обсуждению основного вопроса гепатоканцерогенеза — о природе клетки, из которой развивается опухоль печеночно-клеточного происхождения.

Современные методы и подходы молекулярной онкологии значительно расширили наши представления о том, как может происходить злокачественная трансформация клетки, о начальных, молекулярно-генетических этапах повреждения ее наследственного материала. Вместе с тем дискутируются следующие вопросы: опухоль возникает в результате дедифференцировки зрелых клеток или ареста дифференцировки стволовой клетки или клетки-предшественника; содержат ли опухоли популяцию клеток, обладающих характеристиками опухолевых стволовых клеток, т. е. опухолеиницирующих клеток (Sell, Leffert, 2008); и буквально в последний год встал вопрос о роли эпителиально-мезенхимного перехода (ЭМП), наблюдающегося на поздних стадиях опухолевой прогрессии, в генерации опухолеиницирующих клеток, формирующих метастазы.

В печени человека обнаруживаются две популяции плюрипотентных клеток-предшественников гепатоцитов и холангиоцитов: печеночные стволовые клетки и их потомки — гепатобласти (Schmelzer et al., 2006, 2007). Обе популяции клеток характеризуются высоким уровнем экспрессии ЕрСАМ, что позволяет использовать этот гликопротеин в качестве маркера стволовых клеток и клеток-предшественников печени. На поверхности клеток ГК ЕрСАМ появляется на ранних этапах формирования опухоли и примерно в 35 % случаев ГК. Ямашита с соавторами (Yamashita et al., 2008) использовали ЕрСАМ для выделения новых прогностических подтипов ГК: ЕрСАМ-позитивных, имеющих молекулярные характеристики общие с печеночными стволовыми клетками и клетками-предшественниками — присутствие цитокератина 19, c-Kit, ЕрСАМ, активация Wnt- β -катенин-сигнального каскада — и ЕрСАМ-негативных, проявляющих сходство со зрелыми гепатоцитами. Последующее деление каждой из групп на AFP-позитивную и AFP-негативную подгруппы позволяет охарактеризовать 4 подтипа ГК, различающихся клеточным происхождением и прогнозом. Так, авторы предлагают следующую номенклатуру: ГК, позитивные по ЕрСАМ и AFP, рассматривать как ГК, подобные печеночным стволовым клеткам; ГК, позитивные по ЕрСАМ и негативные по AFP, — как ГК, подобные эпителию желчных протоков; ГК, негативные по ЕрСАМ и позитивные по AFP, — как ГК, подобные предшественникам гепатоцитов; ГК, негативные по ЕрСАМ и AFP, — как ГК, подобные зрелым гепатоцитам. По мнению авторов, ГК, подобные печеночным стволовым клеткам и предшественникам гепатоцитов, возникают в результате ареста дифференцировки клеток-предшественников и характеризуются агрессивным течением заболевания и плохим прогнозом.

Предполагается, что ЕрСАМ-позитивные ГК могут быть организованы в соответствии с иерархической моделью канцерогенеза, согласно которой ЕрСАМ-позитивные клетки могут выступать в качестве опухолеиницирующих клеток, обладающих способностью дифференцироваться в ЕрСАМ-негативные опухолевые клетки (Yamashita et al., 2009). В процессе культивирования фракции, обогащенной ЕрСАМ-позитивными клетками, доля ЕрСАМ-позитивных клеток сокращается до исходного уровня, что может быть результатом их дифференцировки. При этом небольшая популяция ЕрСАМ-позитивных клеток всегда сохраняется. ЕрСАМ-позитивные клетки линии HuH7 эффективно формируют колонии, тогда как ЕрСАМ-негативные клетки не обладают этим свойством.

В печени экспериментальных животных также выявлена потенциальная популяция стволовых клеток (клеток-предшественников). Недифференцированные клетки, которые часто называют овальными клетками из-за овальной (яйцеподобной) формы их ядра, возникающие в результате экспериментального химического канцерогенеза, экспрессируют ЕрСАМ, AFP, CK19, OV-1-антител и α -б-интегрин. Трансплантационные эксперименты показали, что ЕрСАМ-позитивные клетки являются клетками-предшественниками, способными восстанавливать паренхиматозные клетки печени крыс (Yovchev et al., 2007). По данным Окабе с соавторами (Okabe et al., 2009), популяция ЕрСАМ-позитивных клеток печени животных проявляет основные свойства стволовых клеток — способность формировать колонии *in vitro* и при клonalной экспансии дифференцироваться в гепатоциты и холангиоциты.

Представления о существовании опухолеиницирующих клеток находят свое подтверждение при рассмотрении перевиваемых опухолей, индуцированных у крыс в процессе химического канцерогенеза (Morris, Wagner, 1968). Сам факт, что клетки перевиваемых ГК могут культивироваться *in vitro* и трансплантируются, указывает на присутствие в их составе клеток, подобных стволовым, — опухолеиницирующим клеткам. По мнению Тротта (Trott, 1974), пропорция опухолеиницирующих клеток в перевиваемых ГК может составлять от 0.1 до 100 %. В литературе нам не удалось найти исследования, направленные на изучение опухолеиницирующих клеток перевиваемых ГК.

Следует также обсудить еще один недавно возникший аспект, связанный с изучением механизма метастазирования опухолей. Известно, что агрессивность и злокачественность опухолей прежде всего определяются их способностью к метастазированию. Установлено, что по мере опухолевой прогрессии нарушаются контакты между эпителиальными клетками, которые приобретают фенотип мезенхимных клеток, обладающих значительной подвижностью и инвазивностью. Переход клеток от эпителиальной морфологии к мезенхимной получил название эпителиально-мезенхимный переход (ЭМП). Ключевым моментом ЭМП является низкая регуляция экспрессии адгезивного белка Е-кадхерина, обеспечивающего плотный контакт между эпителиальными клетками. При сопоставлении двух клеточных линий ГК, полученных от первичной опухоли и метастатической опухоли, показано, что сверхэкспрессия виментина, компонента промежуточных филаментов, является маркером метастазирующих клеток (Hu et al., 2004). ЭМП сопровождается активацией ряда сигнальных путей, в том числе Wnt- β -катенинового и Ras-MAP-киназного (Guarino et al., 2007). При

этом также происходит изменение актинового цитоскелета, связанное с увеличением подвижности опухолевых клеток, вовлеченных в процесс метастазирования (Popov et al., 2006). На гепатоме Морриса 5123 было показано, что инвазивные опухолевые клетки отличаются повышенными уровнями экспрессии и полимеризации β -актина. Более того, в округлых высокомобильных опухолевых клетках актиновые филаменты были сконцентрированы под плазматической мембраной, формируя субкортикальный «обруч». ЭМП способствует развитию процесса метастазирования, который приводит к распространению по организму опухолевых клеток и их колонизации в органе-мишени. Какими же свойствами должны обладать опухолевые клетки, чтобы сформировать макроскопические метастазы? В работе, выполненной на опухолевых клетках молочной железы, показано, что большинство, если не все клетки, генерируемые во время ЭМП, экспрессируют антигенные маркеры, ассоциированные с фенотипом стволовых клеток, и обладают способностью к сфероидообразованию и формированию колоний в агаре (Mani et al., 2008; Radisky, LaBarge, 2008). Более того, эти клетки экспрессируют маркеры ЭМП, в частности повышенный уровень виментина, фибронектина, Twist и ряд других мезенхимных маркеров. Похожие результаты получены Morellem с сотрудниками (Morel et al., 2008), которые показали, что клетки с характеристиками опухолевых стволовых клеток могут быть генерированы эпителиальными клетками после активации в них Ras—MAPK-сигнального пути и индукции ЭМП. В этой связи возникает ряд вопросов. Все ли опухолевые клетки в состоянии ЭМП превращаются в клетки, обладающие свойствами стволовых клеток (клеток-предшественников), или существует несколько стадий ЭМП? Является ли стадия метастазирования стадией ЭМП, ассоциированной с генерацией опухолеиницирующих клеток?

Вопрос о природе клеток перевивной асцитной гепатомы Зайдела не поднимался с 1963 г. (Зайдела, 1963), хотя накопленные с тех пор данные об этих клетках и биологии опухолей позволяют выдвинуть предположение о происхождении многоклеточных островков. Согласно классификации Ямашита с сотрудниками (Yamashita et al., 2008), экспрессия EpCAM и AFP клетками первичных гепатом указывает на их происхождение от стволовых клеток (клеток-предшественников), но так ли это для перевиваемых опухолей, в том числе для гепатомы Зайдела? Клетки гепатомы Зайдела проявляют характеристики ЭМП: экспрессируют виментин (Karavanova et al., 1987), имеют округлую форму с увеличенным содержанием β -актина в области плазматической мембраны, что может быть признаком повышенной мобильности клеток (Терюкова и др., 2007). Ранее в составе негистоновых белков хроматина клеток гепатомы Зайдела мы идентифицировали ERK2-MAP-киназу, что свидетельствует об активации в клетках Ras-MAPK-сигнального пути (Терюкова и др., 2005), участвующего в индукции ЭМП. Можно предположить, что в клетках гепатомы Зайдела индукция ЭМП связана с активацией Wnt- β -катеин-сигнального пути и генерацией опухолеиницирующих EpCAM-позитивных клеток, формирующих клоны. Гепатома Зайдела является перевиваемой опухолью, клетки которой используются в экспериментальной онкологии более 50 лет, что указывает на их высокую способность к самоподдержанию, и вполне допустимо, что они обогащены популяцией опухолеиницирующих клеток. Клетки, формирующие клоны в асцитической жидкости, при культивировании *in vitro*

прикрепляются к пластинке и образуют монослои, изменения свои морфологические и метаболические характеристики в сторону зрелых гепатоцитов (Staedel, Beck, 1978). В клетках появляются крупные вкрапления гликогена, который часто ассоциирован с многочисленными липидными каплями. Авторы отмечают, что подобный феномен реверсии в метаболизме гликогена ранее никогда не наблюдался для опухолевых клеток печени. Можно предположить, что это является проявлением частичной дифференцировки клеток, возникающих в результате асимметричного деления EpCAM-позитивных опухолеиницирующих клеток, присутствующих в составе многоклеточных островков. На основании литературных данных и результатов проведенных нами исследований в качестве рабочей гипотезы можно допустить, что гепатома Зайдела является перспективной моделью для изучения поздних этапов опухолевой прогрессии, таких как ЭМП и метастазирование, что островки представляют собой клоны клеток, возникающие в процессе ЭМП. Выявление EpCAM-позитивной популяции опухолеиницирующих клеток гепатомы Зайдела и изучение их биологии представляет задачу нашей дальнейшей работы.

Список литературы

- Зайдела Ф. 1963. Применение асцитной гепатомы для изучения цитологии рака. Вопр. онкол. 9 (5) : 25—33.
- 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., Дешева А. С., Блинова Г. И., Миргородская О. А., Иванов В. А. 2007. Сравнительное изучение антигенов, ассоциированных с плазматическими мембранами гепатомных и миогенных клеток крысы, с использованием антиподчечной сыворотки. Цитология. 49 (11) : 944—951.
- Терюкова Н. П., Ивашикина П. А., Миргородская О. А., Иванов В. А. 2005. Выявление и идентификация опухолеассоциированного гетерооргального антигена гепатомы Зайдела в составе негистоновых белков хроматина. Цитология. 47 (12) : 1048—1054.
- Терюкова Н. П., Тюряева И. И., Грандилевская А. Б., Иванов В. А. 1996. Мембранные гетероорганные антигены опухолей гепатоцеллюлярного и миогенного происхождения. Цитология. 38 (10) : 1092—1097.
- Тюряева И. И., Миргородская О. А., Черепанова О. А., Подольская Е. П., Серебрякова М. В., Иванов В. А. 2005. Взаимодействие ламинаина с компонентами плазматических мембран клеток асцитной гепатомы Зайдела. Цитология. 47 (12) : 1039—1047.
- Balzar M., Winter M. J., de Boer C. J., Litvinov S. V. 1999. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). J. Mol. Med. 77 : 699—712.
- Bolarin D., Andy J. J., Alabi Z. O. 1983. Liver immunoreactive prolyl hydroxylase protein in human primary hepatocellular carcinoma. Hepatogastroenterology. 30 : 230—232.
- Braun R. J., Kinkl N., Beer M., Ueffing M. 2007. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. Anal. Bioanal. Chem. 389 : 1033—1045.
- Carloni V., Mazzocca A., Pantaleo P., Cordella C., Laffi G., Gentilini P. 2001. The integrin, alpha δ beta γ , is necessary for the matrix-dependent activation of FAK and MAP kinase and the migration of human hepatocarcinoma cells. Hepatology. 34:42—49.
- Fu Y., Lee A. S. 2003. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. Cancer Biol. Ther. 5 : 741—744.
- Goding J. W., Grobben B., Slegers H. 2003. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. Biochim. biophys. acta. 1638 : 1—19.

- Guarino M., Rubino B., Ballabio G.* 2007. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*. 39 : 305—318.
- Haefner E. W., Kolbe K., Schroeter D., Paweletz N.* 1980. Isolation of a light and a heavy membrane-fraction of the glycogen-free Ehrllich—Lettre substain. *Biochim. biophys. acta*. 603 : 36—51.
- Hosokawa S., Muramatsu M., Nagaike K.* 1989. Detection of membrane-bound α -fetoprotein in human hepatoma cell lines by monoclonal antibody 19F12. *Cancer Res.* 49 : 361—366.
- Hu L., Lau S. H., Tzang C. H., Wen J. M., Wang W., Xie D., Huang M., Wang Y., Wu M. C., Huang J. F., Zeng W. F., Sham J. S., Yang M., Guan X. Y.* 2004. Association of vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis. *Oncogene*. 23 : 298—302.
- Jiang J. L., Tang J.* 2007. CD147 and its interacting proteins in cellular functions. *Acta Physiol. Sinica*. 59 : 517—523.
- Kanekura T., Miyauchi T., Tashiro M., Muramatsu T.* 1991. Basigin, a new member of the immunoglobulin superfamily: genes in different mammalian species, glycosylation changes in the molecule from adult organs and possible variation in the N-terminal sequences. *Cell Struct. Funct.* 16 : 23—30.
- Karavanova I. D., Troianovskij S. M., Bannikov G. A.* 1987. Expression of vimentin and prekeratins in solid and ascites variants of Zajdela hepatoma. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 103 : 462—466.
- Katoh H., Ojima H., Kokubu A., Saito S., Kondo T., Kosuge T., Hosoda F., Imoto I., Inazawa J., Hirohashi S., Shibata T.* 2007. Genetically distinct and clinically relevant classification of hepatocellular carcinoma: putative therapeutic targets. *Gastroenterology*. 133 : 1475—1486.
- Laemmli U. K.* 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*. 227 : 680—685.
- Laurent-Puig P., Legoux P., Bluteau O., Belghiti J., Franco D., Binot F., Monges G., Thomas G., Bioulac-Sage P., Zucman-Rossi J.* 2001. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*. 120 : 1763—1773.
- Lee J. S., Heo J., Libbrecht L., Chu I. S., Kaposi-Novak P., Calvisi D. F., Mikaelyan A., Roberts L. R., Dematris A. J., Sun Z., Nevens F., Roskams T., Thorgerisson S. S.* 2006. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat. Med.* 12 : 410—416.
- Liu L. X., Jiang H. C., Liu Z. H., Zhou J., Zhang W. H., Zhu A. L., Wang X. Q., Wu M.* 2002. Intergrin gene expression profiles of human hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 8 : 631—637.
- Lu B., McClatchy D. B., Kim J. Y., Yates J. R.* 2008. Strategies for shotgun identification of integral membrane proteins by tandem mass spectrometry. *Proteomics*. 8 : 3947—3955.
- Mamori S., Nagatsuma K., Matsuura T., Ohkawa K., Hano H., Fukunaga M., Matsushima M., Masui Y., Fushiyama N., Onoda H., Se-arashi Y., Takagi I., Tagiri H.* 2007. Useful detection of CD147 (EMMPRIN) for pathological diagnosis of early hepatocellular carcinoma in needle biopsy samples. *World J. Gastroenterol.* 13 : 2913—2917.
- Mani S. A., Guo W., Liao M. J., Eaton E. N., Ayyanan A., Zhou A. Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C. C., Shipitsin M., Campbell L. L., Polyak K., Briskin C., Yang J., Weinberg R. A.* 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 133 : 704—715.
- 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.
- Maurice M., Rajho M. N., Bello V., Trugnan G., Ait S. T.* 1999. Polarized expression of type I phosphodiesterases in epithelial cells. *J. Soc. Biol.* 193 : 135—138.
- Maurice M., Rogier E., Cassio D., Fieldmann G.* 1988. Formation of plasma membrane domains in rat hepatocytes and hepatoma cell lines in culture. *J. Cell Sci.* 90 : 79—92.
- Morel A. P., Liévre M., Thomas C., Hinkal G., Ansieau S., Puisieux A.* 2008. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*. 3 : e2888.
- Morris H. P., Wagner B. P.* 1968. Induction and transplantation of rat hepatomas with different growth rate (including «minimal deviation» hepatomas). *Meth. Cancer Res.* IV : 125—152.
- Okabe M., Tsukahara Y., Tanaka M., Suzuki K., Saito S., Kamiya Y., Tsujimura T., Nakamura K., Miyajima A.* 2009. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM⁺ cells of normal and injured mouse liver. *Development*. 136 : 1951—1960.
- 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.
- Popow A., Nowak D., Malicka-Blaszkiewicz M.* 2006. Actin cytoskeleton and β -actin expression in correlation with higher invasiveness of selected hepatoma Morris 5123 cells. *J. Physiol. Pharmacol.* 57 : 111—123.
- Radisky D. C., LaBarge M. A.* 2008. Epithelial-mesenchymal transition and the stem cell phenotype. *Cell Stem Cell*. 2 : 511—512.
- Sarcione E. J., Smalley J. R.* 1976. Intracellular synthesis of α -fetoprotein and fibrinogen without secretion by Zajdela at ascites hepatoma cells. *Cancer Res.* 36 : 3203—3206.
- Schmelzer E., Reid L. M.* 2008. EpCAM expression in normal, non-pathological tissues. *Front. Biosci.* 13 : 3096—3100.
- Schmelzer E., Wauthier E., Reid L. M.* 2006. The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cells*. 24 : 1852—1858.
- Schmelzer E., Zhang L., Bruce A., Wauthier E., Ludlow J., Yao H. L., Moss N., Melhem A., McClelland R., Turner W., Kulik M., Sherwood S., Tallheden T., Cheng N., Furth M. E., Reid L. M.* 2007. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *JEM*. 204 : 1973—1987.
- Scioazec J. Y., Maurice M., Moreau A., Feldmann G.* 1988. Analysis of hepatocyte plasma membrane polarity during rat azo dye hepatocarcinogenesis using monoclonal antibodies directed against domain-associated antigens. *Cancer Res.* 48 : 6882—6890.
- Scott L. J., le Delautier D., Meerson N. P., Trugnan G., Goding J. W., le Maurice M.* 1997. Biochemical and molecular identification of distinct forms of alkaline phosphodiesterase I expressed on the apical and basolateral surface of rat hepatocytes. *Hepatology*. 25 : 995—1002.
- Sell S., Leffert H. L.* 2008. Liver cancer stem cells. *J. Clin. Oncol.* 26 : 2800—2805.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.* 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68 : 850—858.
- Shin B. K., Wang H., Yim A. M., Le Naour F., Brichory F., Jang J. H., Zhao R., Puravs E., Tra J., Michael C. W., Misek 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.
- Speers A. E., Wu C. C.* 2007. Proteomics of integral membrane proteins — theory and application. *Chem. Rev.* 107 : 3687—3714.
- Staevel C., Beck J. P.* 1978. Resurgence of glycogen synthesis and storage capacity in cultured hepatoma cells. *Cell Differentiation*. 7 : 61—71.
- Terada K., Manchikalapudi P., Noiva R., Jauregui H. O., Stockert R. J., Schilsky M. L.* 1995. Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 270 : 20 410—20 416.
- Trott K. R.* 1974. Tumour stem cells: the biological concept and its application in cancer treatment. *Radiother. Oncol.* 30 : 1—5.
- Turano C., Coppari S., Altieri F., Ferraro A.* 2002. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J. Cell. Physiol.* 193 : 154—163.
- Volpes R., van den Oord J. J., Desmet J.* 1993. Integrins as differential cell lineage markers of primary liver tumors. *Amer. J. Pathol.* 142 : 1483—1492.
- Yamashita T., Budhu A., Forgues M., Wang X. W.* 2007. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-B-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 67 : 10 831—10 839.

Yamashita T., Forgues M., Wang W., Kim J. W., Ye Q., Jia H., Budhu A., Zanetti K. A., Chen Y., Qin L. X., Tang Z. Y., Wang X. W. 2008. EpCAM and α -fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 68 : 1451—1461.

Yamashita T., Ji J., Budhu A., Forgues M., Yang W., Wang H. Y., Jia H., Ye Q., Qin L. X., Wauthier E., Reid L. M., Minato H., Honda M., Kaneko S., Tang Z. Y., Wang X. W. 2009. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology.* 136 : 1012—1024.

Yano Y., Hayashi Y., Sano K., Nagano H., Nakaji M., Seo Y., Ninomiya T., Yoon S., Yokozaki H., Kasuga M. 2004. Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-1 (R-NPP1/PC-1) and -3 (E-NPP3/CD203c/PD-Ibeta/B10/gp130(RB13-6) in inflammatory and neoplastic bile duct diseases. *Cancer Lett.* 207 : 139—147.

Yano Y., Hayashi Y., Sano K., Shinmaru H., Kuroda Y., Yokozaki H., Yoon S., Kasuga M. 2003. Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-3 (E-NPP3/CD203c/PD-I beta/B10/gp130RB13-6) in human colon carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* 212 : 763—766.

Yovchev M. I., Grozdanov P. N., Joseph B., Gupta S., Dabeva M. D. 2007. Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *Hepatology.* 45 : 139—149.

Zhang L. J., Wang X. E., Peng X., Wei Y. J., Cao R., Liu Z., Xiong J. X., Yin X. F., Ping C., Liang S. 2006. Proteomic analysis of low-abundant integral plasma membrane proteins based on gels. *Cell. Mol. Life Sci.* 63 : 1790—1804.

Zhao Y., Zhang W., Kho Y., Zhao Y. 2004. Proteomic analysis of integral plasma membrane proteins. *Anal. Chem.* 76 : 1817—1823.

Поступила 12 III 2010

DETECTION AND IDENTIFICATION OF THE TUMOR-ASSOCIATED ANTIGENS IN THE FRACTION ENRICHED WITH PLASMA MEMBRANES OF THE ZAJDELA HEPATOMA CELLS

N. P. Teryukova,^{1,} O. A. Mirgorodskaya,² M. V. Serebryakova,³ V. A. Ivanov¹*

¹ Institute of Cytology RAS, ² Institute of Analytical Instrumentation RAS, St. Petersburg,
and ³ Scientific Research Institute of Physical-Chemical Medicine, Moscow;
* e-mail: npter@yandex.ru

Tumor-associated antigens 45, 57, 80 and 130 kDa were detected using tumor-specific rabbit immune serum in the fraction enriched with plasma membrane of the rat Zajdela hepatoma cells and isolated on the immunosorbent. Revealed proteins were identified as integrin β -1, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-3 (E-NPP3), basigin, epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), α -fetoprotein (AFP) and protein chaperones — glucose-regulated protein 78 (GRP78) and protein disulfide-isomerase (PDI) A1 by mass spectrometry technique. Functions and characteristics of these proteins in tumor cells and some aspects of the Zajdela hepatoma cells origin are discussed.

Key words: hepatoma, mass spectrometry, tumor-associated antigens, tumor-initiating cells, epithelial cell adhesion molecule, epithelial-mesenchymal transition.