



УДК 576.54:577.114.7

ВСТРАИВАНИЕ НЕОГЛИКОЛИПИДОВ В КЛЕТКИ K562. МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ УГЛЕВОДЗАВИСИМОГО ЛИЗИСА КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ ЕСТЕСТВЕННЫМИ КИЛЛЕРАМИ

© 1998 г. Е. И. Коваленко[#], М. А. Саблина, С. В. Хайдуков, Е. В. Хирова, Н. В. Бовин*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,**117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 20.11.97 г. Принята к печати 28.11.97 г.

Для изучения роли олигосахаридов поверхности клетки в регуляции эффекторной функции естественных киллеров (NK) разработана модельная система. Синтезированы полимерные гликоконъюгаты типа Gluc-РАА-РЕ и Gluc-РАА(Flu)-РЕ (где Gluc – остаток сахара, РАА – поли(N-2-гидроксиэтилакриламид), РЕ – остаток фосфатидилэтаноламина, Flu – остаток производного флуоресцеина), и изучена их ассоциация с мембраной живых клеток K562.

Ключевые слова: NK, Le^x, неогликоконъюгаты.

Естественные киллеры (NK) обладают способностью спонтанно лизировать некоторые опухолевые и инфицированные вирусами клетки [1]. Эта способность регулируется за счет баланса позитивных и негативных сигналов от клеток-мишеней [2]. Так, взаимодействие с молекулами МНС класса I ингибирует эффекторную функцию NK-клеток [3, 4]. В ряде работ показано, что олигосахариды поверхности клеток-мишеней могут принимать участие в распознавании их NK-клетками, причем взаимодействие с углеводами может как усиливать, так и ослаблять цитотоксичность естественных киллеров [5–11]. В частности, существуют данные, что позитивным сигналом для NK-клеток человека может служить антиген CD15 (трисахарид Le^x) [7], а негативным – углеводные цепи гликофорина А [10]. На самих NK-клетках идентифицированы уникальные лектины [12–17], принимающие участие в процессе узнавания "свое-чужое" на потенциальных клетках-мишенях. Таким образом, существующие литературные данные не оставляют сомнений в участии углевод-лектинового узнавания в процессе клеточного лизиса, опосредованного NK-клетками. Однако систематически роль гликоконъюга-

тов в этом процессе до сих пор не изучалась, а данные отдельных исследований трудно сопоставлять из-за существенных методических различий. В данной работе предлагается экспериментальная модель, позволяющая изучать процесс лизиса естественными киллерами человека клеток-мишеней (линия K562), в мембрану которых встроены синтетические гликоконъюгаты.

Использованные в данной работе неогликоконъюгаты, Gluc-РАА-РЕ, представляют собой водорастворимые молекулы, в то же время обладающие гидрофобным участком, позволяющим их легкое встраивание в мембрану. При молекулярной массе около 40 кДа гликоконъюгат несет на себе несколько десятков углеводных цепей (Gluc) и остатков фосфатидилэтаноламина (РЕ). Предполагалось, что такая мультимерная структура имеет несколько качеств, полезных для решения поставленной задачи. Во-первых, в Gluc-РАА-РЕ несколько углеводных цепей, сближенных в пространстве благодаря привязке к полимеру, образуют кластер, имитирующий структуру гликопротеина или сближенных гликолипидов, т.е. ситуацию, постулируемую для углеводопосредованного клеточного узнавания [18]. Во-вторых, РАА служит своеобразным спейсером, экспонирующим углеводные цепи над гликокаликсом, делая их доступными для NK-клеток. В-третьих, конструкция неогликоконъюгата такова, что только часть остатков фосфатидилэтаноламина заякорена в мембране клеток-мишеней, в то время как остальные образуют внутреннюю мицеллу [19]; после реализации специфического углевод-белкового взаимодействия двух клеток (NK и мишени) незаякоренные остатки

Сокращения: Flu – остаток 5-((5-аминопентил)тиоуретидил)флуоресцеина; NK – естественные киллеры; Le^x – Galβ1–4(Fucα1–3)GlcNAc; Gluc – остаток 3-аминопропилгликозида Le^x (Galβ1–4(Fucα1–3)GlcNAcβ1–(CH₂)₃NH₂); МНС – главный комплекс гистосовместимости; РЕ – остаток фосфатидилэтаноламина; PNPA – поли(4-нитрофенил-акрилат); РАА – поли(N-2-гидроксиэтилакриламид); PBS – 0.01 M K⁺, Na⁺-фосфатный буфер, pH 7.2, содержащий 0.15 M NaCl.

[#]Автор для переписки.

могут играть роль дополнительного стабилизирующего взаимодействие фактора, имитируя тем самым реальную ситуацию, когда клетки связываются благодаря концертному действию нескольких типов рецепторов.

Синтез Glyc-РАА(Flu)-РЕ осуществлялся по методологии, описанной ранее [19, 20]; данный подход позволяет в широком пределе варьировать содержание лигандов в конъюгате, причем вводить в полимерную молекулу именно столько остатков, сколько необходимо. В данном случае мы остановились на содержании углеводных цепей 15 мольн. % (т.е. примерно каждое седьмое мономерное звено РАА несет остаток углевода), а содержание РЕ варьировали, чтобы найти оптимальное для встраивания в мембрану, конкретно синтезировали молекулы с 10 и 20 мольн. % РЕ. Чтобы иметь возможность изучать кинетику встраивания конъюгата в мембрану с помощью проточной цитофлуориметрии, конъюгат метили флуоресцеином (1 мольн. %). После отработки условий встраивания предполагалось использовать конъюгаты без флуоресцеиновой метки, т.е. Glyc-РАА-РЕ. Чтобы показать, что процесс встраивания неогликоконъюгата в мембрану обусловлен именно остатками фосфатидилэтаноламина, использовали конъюгат Glyc-РАА-Flu (отрицательный контроль), не содержащий РЕ. В качестве углевода применяли трисахарид Le^x , известный как положительный сигнал для естественных киллеров [7]. Факт встраивания гликоконъюгата в мембрану доказывался цитофлуориметрически; пространственную доступность остатков Le^x на клетке-мишени оценивали по наличию усиления лизиса нагруженных гликоконъюгатом клеток естественными киллерами.

Встраивание гликоконъюгатов в мембрану клеток K562. Для отработки техники встраивания первоначально был синтезирован гликоконъюгат Glyc(15%)-РАА(Flu, 1%)-РЕ(10%). В ходе работы экспериментально была подобрана его концентрация, которая приводила к наибольшей интенсивности флуоресценции. Сравнение интенсивности флуоресценции стандартных частиц, содержащих по 31 000 флуоресцеиновых эквивалентов, с флуоресценцией клеток, нагруженных Glyc-РАА(Flu)-РЕ, позволило определить среднестатистическое количество углеводных остатков и полимерных молекул на клетках. При концентрации зонда 100 мкг/мл удельное количество остатков Le^x составляло около 3×10^6 на клетку, что соответствует приблизительно 10^5 молекул гликоконъюгата на клетку.

Была изучена стабильность встроенного гликоконъюгата. Для этого проводили цитофлуориметрический анализ клеток сразу после встраивания и через 4 и 24 ч. Сравнение интенсивности флуоресценции позволило судить об изменении

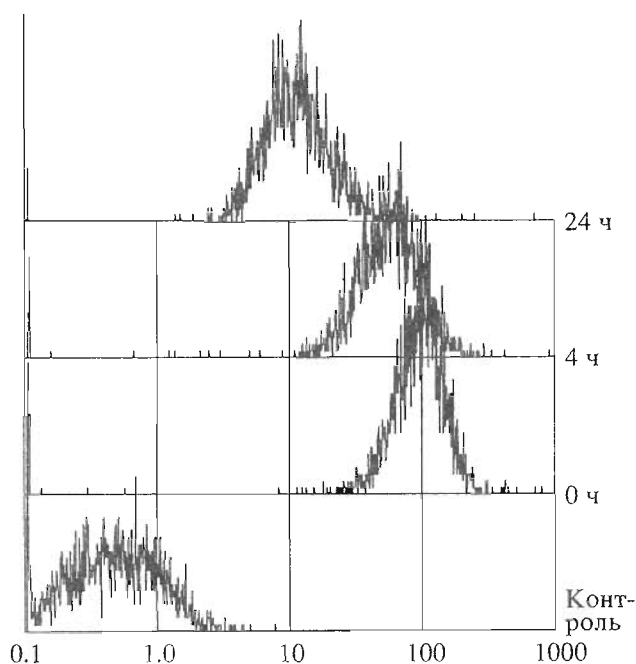


Рис. 1. Кинетика сброса Le^x -РАА(Flu)-РЕ с мембраны клеток K562. Гистограммы распределения интенсивности флуоресценции. По оси абсцисс – логарифм интенсивности флуоресценции, по оси ординат – число клеток. В качестве контроля использовали немеченые клетки.

количества молекул Glyc-РАА(Flu)-РЕ, находящихся на клеточной поверхности. Было показано, что с течением времени интенсивность флуоресценции клеток уменьшается, что свидетельствует о частичной диссоциации Glyc-РАА(Flu)-РЕ с клеточной мембраной (рис. 1). Рассчитанное удельное количество остатков трисахарида Le^x через 4 ч падало до 2×10^6 , а спустя сутки уменьшалось до 4×10^5 на клетку.

Жизнеспособность клеток, оцененная методом проточной цитофлуориметрии до и после встраивания Glyc-РАА(Flu)-РЕ, а также после 24-часового культивирования, оставалась неизменной (более 90%).

Влияние количества РЕ в Glyc-РАА(Flu)-РЕ на его встраивание в клетки. В целях оптимизации встраивания были синтезированы структуры, содержащие различный мольный процент РЕ. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что гликоконъюгат с 20 мольн. % РЕ взаимодействует с клеточной поверхностью хуже, чем гликоконъюгат с 10 мольн. % РЕ (рис. 2). Этот эффект можно объяснить тем, что структуры с более высоким содержанием липида обладают способностью к образованию внутренней мицеллы [19] и это препятствует их связыванию с клеточной мембраной. В свою очередь, необходимость липидного компонента для взаимодействия

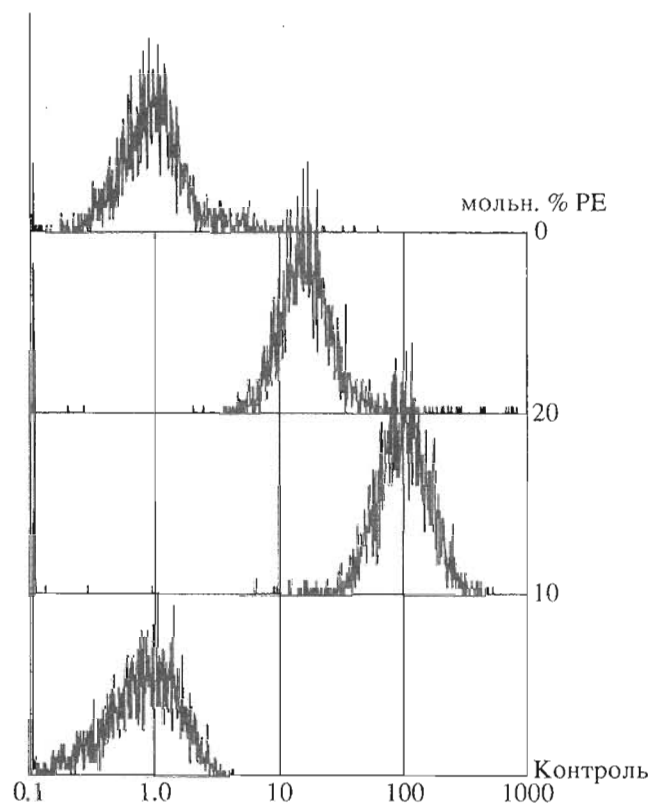


Рис. 2. Степень встраивания Le^x -PAA(Flu)-PE в клетки K562 в зависимости от содержания в конъюгате PE (мольн. %). Гистограммы распределения интенсивности флуоресценции. По оси абсцисс – логарифм интенсивности флуоресценции, по оси ординат – число клеток. В качестве контроля использовали немеченые клетки.

гликоконъюгата с клетками была доказана безуспешной попыткой встроить в мембрану гликоконъюгат, не содержащий PE. Интенсивность флуоресценции клеток в этом случае приближалась к контрольной.

Таким образом, были подобраны оптимальные условия для присоединения неогликоконъюгатов к мембране клеток K562. Разработанная модельная система была опробована для оценки цитотоксичности НК-клеток человека. По результатам предварительного тестирования, НК-зависимый лизис клеток-мишеней, модифицированных $\text{Glyc}(15\%)\text{-PAA}(\text{Flu}, 1\%)\text{-PE}(10\%)$ увеличивается по сравнению с контрольным, что хорошо соотносится с литературными данными [7]. Подробные данные будут опубликованы позже.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3-Аминопропилгликозид Le^x , а также Glyc -PAA-Flu получены от фирмы Syntesome GmbH (Мюнхен, Германия), 5-((5-аминопентил)тиоуреидил)флуоресцеин – от фирмы Molecular Probes (Лейден, Нидерланды). В работе использовали

PNPA, полученный по методу [20], M 40–50 кДа; фосфатидилэтанолламин из яичного желтка (Sigma, США); D,L - α -токоферол (Serva, Германия); хлороформ (Merck, Германия); DMSO , DMF, Et_3N и 2-этанолламин (“Реахим”). Растворители освобождали от воды и первичных аминов, используя стандартные методы. ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 (Merck, Германия) в системах этанол–бутанол–пиридин–вода–уксусная кислота, 10 : 1 : 1 : 1 : 0.3 (А) и хлороформ–метанол–вода, 65 : 25 : 4 (Б). Присутствие углеводного компонента обнаруживали погружением пластинок в 7% H_3PO_4 с последующим прогреванием при 150°C или нингидрином, присутствие фосфатидилэтанолламина обнаруживали нингидрином.

Получение неогликоконъюгатов типа Glyc -PAA(Flu)-PE (общая методика). Для получения конъюгатов использовали модифицированный метод [19, 20]. К раствору 5 мг PNPA в 0.26 мл DMSO (20 мг/мл, 25.9 мкмоль) прибавляли 5-((5-аминопентил)тиоуреидил)флуоресцеин в количестве 1 мольн. % по отношению к нитрофенильным группам полимера (0.259 мкмоль) и выдерживали сутки, затем без выделения прибавляли полученный конъюгат Flu с полимером (раствор 1) к раствору 3-аминопропилгликозида Le^x (количество варьировалось, см. ниже) в смеси равных объемов DMSO и DMF. К полученной смеси прибавляли раствор фосфатидилэтанолламина в хлороформе (количество варьировалось, концентрация 11 мг/мл, содержащий 0.1 мольн. % α -токоферола (антиоксидант). Затем прибавляли Et_3N (3 объемн. % общего объема реакционной смеси). После прибавления каждого реагента смесь тщательно перемешивали. Реакционную смесь выдерживали при 40°C в течение 24 ч. Полноту конденсации контролировали с помощью ТСХ: в системе А на отсутствие исходного сахара и в системе Б на отсутствие исходного фосфатидилэтанолламина. Затем добавляли 2-этанолламин (10 объемн. % общего объема реакционной массы), тщательно перемешивали и оставляли на 24 ч при комнатной температуре. Полученный конъюгат очищали гель-фильтрацией на колонке (2 × 25 см) с Sephadex LH-20, элюировали смесью ацетонитрил–вода, 1 : 1. Фракции, содержащие конъюгат, концентрировали в вакууме, растворяли в небольшом количестве воды и лиофилизовали.

$\text{Glyc}(15\%)\text{-PAA}(\text{Flu}, 1\%)\text{-PE}(10\%)$ получали из 0.67 мг 3-аминопропилгликозида Le^x (1.14 мкмоль), растворенного в смеси DMSO (50 мкл) и DMF (65 мкл), 74 мкл раствора 1 и 0.55 мг фосфатидилэтанолламина (0.76 мкмоль) в 50 мкл CHCl_3 с добавлением 7 мкл Et_3N и 24 мкл 2-этанолламина. Выход 1.6 мг (80%).

$\text{Glyc}(15\%)\text{-PAA}(\text{Flu}, 1\%)\text{-PE}(20\%)$ получали из 0.3 мг 3-аминопропилгликозида Le^x (0.51 мкмоль),

растворенного в смеси DMSO (50 мкл) и DMF (45 мкл), 34 мкл раствора 1 и 0.52 мг фосфатидилэтанолamina (0.78 мкмоль) в 47 мкл CHCl_3 с добавлением 5.5 мкл Et_3N и 18 мкл 2-этанолamina. Выход 1.1 мг (92%).

Получение неогликоконъюгатов Glyc-РАА-РЕ проводили как описано выше, опуская присоединение Flu-метки к полимеру.

Клетки. Для встраивания гликоконъюгатов в клеточную мембрану использовали клетки человеческой эритролейкемической линии K562, которые являются типичными мишенями естественных киллеров. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 5% телячьей эмбриональной сыворотки (инактивированной нагреванием), 40 мкг/мл гентамицина, 2 мМ L-глутамина, 1 мМ пирувата натрия (все – Flow, Великобритания) и 0.05 мМ 2-меркаптоэтанола (Sigma, США) во влажной атмосфере с 5% CO_2 при 37°C.

Встраивание неогликоконъюгатов в клетки K562. Перед встраиванием клетки предварительно инкубировали в среде без сыворотки в течение суток. Встраивание гликоконъюгатов в клетки проводили в PBS. Для этого клетки однократно отмывали PBS центрифугированием (200g, 10 мин) и инкубировали 1 ч с гликоконъюгатом (100 мкг/мл) в объеме 200 мкл (10^6 кл./мл) при периодическом перемешивании. Затем клетки дважды отмывали PBS, как описано выше, и использовали в эксперименте.

Для оценки кинетики диссоциации гликоконъюгата клетки после встраивания культивировали в среде RPMI-1640 (2×10^5 /мл) с добавлением 40 мкг/мл гентамицина, 2 мМ L-глутамина, 1 мМ пирувата натрия и 0.05 мМ 2-меркаптоэтанола в течение 4 и 24 ч. Перед цитофлуориметрическим анализом клетки дважды отмывали PBS, как описано выше.

Проточная цитофлуориметрия. Анализ флуоресценции клеток (не менее 5000) проводили на лазерном проточном цитофлуориметре EPICS "ELITE" (Coulter Electronics Inc., США). Для исключения из зоны анализа частиц, не соответствующих по размерам и гранулярности живым клеткам, вводили логические ограничения в гистограммы распределения частиц по малоугловому и 90-градусному светорассеянию и результаты подвергали математической обработке с использованием программы MultiGraph и IMMUNO 4 (Coulter Electronics Inc., США).

Количество молекул Glyc-РАА(Flu)-РЕ, связанных с клетками, оценивали в сравнении с флуоресценцией микросфер IMMUNO-BRIT Level II (Coulter Electronics Inc., США), содержащих по 31000 флуоресцеинового эквивалентов. Удельное количество остатков олигосахаридов рассчитывали исходя из мольных соотношений Flu и Glyc.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 97-04-49766-а).

Авторы выражают благодарность А.М. Сапожникову за участие в подготовительном этапе данной работы, Е.Л. Водовозовой и А.Б. Тузикову за ценное обсуждение результатов, А.А. Формановскому – за синтез РНРА (все – сотрудники ИБХ РАН).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Trinchieri G. // Adv. Immunol. 1989. V. 47. P. 187–376.
2. Yokoyama W.M. // Curr. Opin. Immunol. 1995. V. 7. P. 110–120.
3. Ljunggren H.G., Karre K. // Immunol. Today. 1990. V. 11. P. 7–10.
4. Carbone E., Terrazzano G., Colonna M., Tuosto L., Piccolella E., Franksson L., Palazzolo G., Petez-Villar J.J., Fontana S., Karre K., Zappacosta S. // Eur. J. Immunol. 1996. V. 26. P. 683–689.
5. Werkmeister J.A., Pross H.F., Roder J.C. // Int. J. Cancer. 1983. V. 32. P. 71–78.
6. Ades E.W., Hinson A., Culwell M. // J. Clin. Lab. Immunol. 1986. V. 19. P. 65–69.
7. Zarcone D., Tilden A.B., Friedman H.M., Grossi C.E. // Cancer Res. 1987. V. 47. P. 2674–2682.
8. Ahrens P.B. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 385–391.
9. Bezouska K., Yuen C.T., O'Brien J., Childs R.A., Chai W., Lawson A.M., Drbal K., Fiserova A., Pospisil M., Feizi T. // Nature. 1994. V. 372. P. 150–157.
10. Ouagari K.E., Teissie J., Benoist H. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 26970–26975.
11. Kobayashi E., Motoki K., Yamaguchi Y., Uchida T., Fukushima H., Koezuka Y. // Bioorg. Med. Chem. 1996. V. 4. P. 615–619.
12. Giorda R., Weisberg E.P., Tze Kin Ip, Trucco M. // J. Immunol. 1992. V. 149. P. 1957–1963.
13. Yabe T., McSherry C., Bach F.H., Fisch P., Schall R.P., Sondel P.M., Houchins J.P. // Immunogenetics. 1993. V. 37. P. 455–460.
14. Lanier L.L., Chang C., Phillips J.H. // J. Immunol. 1994. V. 153. P. 2417–2428.
15. Daniels B.F., Nakamura M.C., Rosen S.D., Yokoyama W.M., Seaman W.E. // Immunity. 1994. V. 1. P. 785–792.
16. Brennan J., Takei F., Wong S., Mager D.L. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 9691–9694.
17. Carretero M., Cantoni C., Bellon T., Bottino C., Biassony R., Rodriguez A., Perez-Villar J.J., Moretta L., Moretta A., Lopez-Botet M. // Eur. J. Immunol. 1997. V. 27. P. 563–567.
18. Nakomori S. // Biochem. Soc. Trans. 1993. V. 21. P. 583–595.
19. Бовин Н.В. // Биооргани. химия. 1996. Т. 22. С. 643–663.
20. Bovin N.V., Korchagina E.Yu., Zemlyanukhina T.V., Byratanova N.E., Galanina O.E., Zemlyakov A.E., Ivanov A.E., Zubov V.P., Mochalova L.V. // Glycoconj. J. 1993. V. 10. P. 142–151.

**The Incorporation of Neoglycolipids into K562 Cells:
A Model for the Study of Carbohydrate-dependent Cytolysis of Target Cells
by Natural Killer Cells**

E. I. Kovalenko, M. A. Sablina, S. V. Khaidukov, E. V. Khirova, and N. V. Bovin

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

A model system was developed to study the role of cell surface oligosaccharides in cytotoxicity mediated by natural killer (NK) cells. Polymeric glycoconjugates Glyc–PAA–PE and Glyc–PAA(Flu)–PE (where Glyc is the 3-aminopropyl Le^x residue, PAA is the poly(*N*-2-hydroxyethylacrylamide) matrix, Flu is the residue of a fluorescein derivative, and PE is the phosphatidylethanolamine residue) were synthesized, and their association with the membranes of living K562 cells was studied.

Key words: NK cells, Le^x, neoglycoconjugates