



УДК 577.114.7'314.62.088:576.54

МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ЛИПОФИЛЬНЫХ ГЛИКОКОНЪЮГАТОВ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК С НАТУРАЛЬНЫМИ КИЛЛЕРАМИ

© 2004 г. Е. И. Коваленко[#], Е. В. Хирова, И. М. Молотковская, Т. В. Овчинникова,
М. А. Саблина, А. М. Сапожников, С. В. Хайдуков, Н. В. Бовин

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 14.02.2003 г. Принята к печати 18.04.2003 г.

С целью изучения роли углеводов поверхности клеток-мишеней в опосредованной натуральными киллерами (NK-клетками) цитотоксичности разработана экспериментальная модель, включающая модификацию состава сахаридов на клеточной поверхности с помощью неогликопротеинов. Синтезированы полимерные гликоконъюгаты в виде способных встраиваться в клеточную мембрану производных типа Glyc-PAA-PEA и Glyc-PAA(Flu)-PEA (где Glyc – остаток сахарида, PAA – полимер, PEA – остаток фосфатидилэтаноламина, Flu – остаток флуоресцеина). Выбраны оптимальная структура неогликоконъюгатов и условия для их встраивания в клетки линий K562 и Raji, различных по чувствительности к действию NK-клеток. С помощью флуоресцентномеченых производных Glyc-PAA(Flu)-PEA изучен механизм ассоциации гликоконъюгатов с плазматической мембраной и кинетика их элиминации с клеточной поверхности. Продемонстрирована пространственная доступность углеводных лигандов для взаимодействия с NK-клетками человека. Показано, что модифицированные трисахаридом Le^x клетки-мишени более чувствительны к действию NK-клеток человека, чем исходные клетки.

Ключевые слова: NK-клетки; неогликоконъюгаты; Le^x -трисахарид; цитотоксичность.

ВВЕДЕНИЕ

Натуральные киллеры (NK-клетки) являются эффекторами врожденного иммунитета и выполняют в организме специализированную цитотоксическую функцию, направленную на уничтожение опухолевых и вирусифицированных клеток. NK-клетки не нуждаются в предварительной sensibilизации для поражения мишени и обладают способностью самостоятельно распознавать поврежденные клетки, подлежащие элиминации [1]. Механизмы активации NK-клеток и их взаимодействия с клетками-мишениями в настоящее

время активно изучаются. Установлено, что реактивность NK-клеток регулируется балансом между поступающими с поверхности клетки-мишени позитивными сигналами, индуцирующими их эффекторные функции, и негативными сигналами, которые препятствуют клеточному лизису. В процессе распознавания клеток участвует ряд рецепторов натуральных киллеров. Лигандами для таких рецепторов служат различные молекулы поверхности клеток-мишеней, многие из которых еще не идентифицированы. Известно, например, что в качестве негативного сигнала для NK-клеток выступают молекулы MHC класса I на поверхности клеток-мишеней [2]. Позитивные сигналы в различных моделях опосредуются различными рецепторно-лигандными взаимодействиями и зависят как от типа и состояния NK-клеток, так и от доступности определенных клеточных структур на поверхности мишени.

В современной литературе существует множество данных, указывающих на значительную роль сахаридов, представленных на клеточной поверхности, в распознавании опухолевых и ксеногенных клеток натуральными киллерами. Показано как позитивное, так и негативное влияние различных сахаридов на опосредованную NK-клетками цитотоксичность [3–10]. С другой сто-

Сокращения: CAM – кальценин AM; EthI – этидиум гомодимер-1; FCS – эмбриональная телячья сыворотка (fetal calf serum); FITC – флуоресцеинизотиоцианат; Flu – остаток флуоресцеина; Glyc – остаток олигосахарида; I_{Π}^a – интенсивность флуоресценции, ассоциированной с клетками; I_{Π}^f – интенсивность флуоресценции в растворе; MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex); NK-клетки – натуральные киллеры (natural killer cells); PAA – полиакриламид; PBS – 0.01 М K^+ , Na^+ -фосфатный буфер, pH 7.2, содержащий 0.15 М NaCl; PE – фикоэритрин; PEA – остаток фосфатидилэтаноламина; ПМН – периферические мононуклеары человеческой крови.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 330-40-11; эл. почта: kovalen@ibch.ru).

роны, показано, что при опухолеобразовании происходят драматические изменения в экспрессии углеводов на клеточной поверхности [11–13]. Однако до сих пор не ясно, углеводные составляющие каких гликопroteинов или гликолипидов приводят к изменению функциональной активности натуральных киллеров. Неизвестно также, с какими рецепторами NK-клеток взаимодействуют углеводы поверхности клеток-мишеней.

Гетерогенность природных гликоконъюгатов, особенно гликопroteинов, осложняет их применение в качестве инструментов для исследования углеводсвязывающих молекул. Отмечающийся в литературе значительный разброс данных объясняется различиями применяемых методик. Данные, полученные с помощью традиционного подхода с использованием олигосахаридов для ингибирования опосредованной NK-клетками цитотоксичности в такой сложной системе, как смесь эффекторов и мишенией, трудно интерпретировать однозначно, так как, во-первых, лектины присутствуют на обоих типах клеток и, во-вторых, киллинг может предшествовать углеводопосредованная адгезия. Метод, включающий модификацию поверхности клеток-мишеней гликозилтрансферазами, оказался очень плодотворным [4, 8], однако он также не дает определенности в интерпретации результатов, так как ферментативной модификации одновременно подвергается множество типов гликоконъюгатов. Возникает необходимость разработки новых подходов для изучения роли олигосахаридов, представленных на поверхности клеток-мишеней, в регуляции эффекторной функции NK-клеток. Мы полагаем, что таким подходом является встраивание синтетических липофильных гликоконъюгатов строго определенной структуры [14], модифицирующее поверхность клеток. Этот подход не только дополняет использованные ранее методы, но и открывает возможность более строгой интерпретации результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для модификации углеводной композиции клеточной поверхности были использованы неогликоконъюгаты на основе полиакриламида (PAA) типа Glyc-PAA(Flu)-PEA, которые представляют собой водорастворимые полимерные молекулы размером около 40 кДа. Предполагалось, что указанные гликоконъюгаты способны встраиваться в клеточную мембрану за счет гидрофобных остатков фосфатидилэтаноламина (PEA). Каждая молекула гликоконъюгата несет несколько десятков сахаридов определенной структуры, т.е. фактически кластер олигосахаридов. Подобная кластеризация углеводных цепей имеет важное значение для углеводопосредованного клеточного узнавания [15]. Для изучения характеристик взаимодействия неогликоконъюгатов с мембранный клеток-мише-

ней с целью оптимизации процесса встраивания применяли гликоконъюгаты, меченные флуоресценином. Углеводный компонент в этих гликоконъюгатах был представлен трисахаридом $\text{Le}^x - \text{Gal}\beta 1\text{-}4(\text{Fuc}\alpha 1\text{-}3)\text{GlcNAc}\beta$. В последующих экспериментах по оценке опосредованной NK-клетками цитотоксичности для модификации клеток-мишеней были использованы немеченные гликоконъюгаты, содержащие углеводные детерминанты Le^x , B_{di} ($\text{Gal}\alpha 1\text{-}3\text{Gal}\beta$) и SiaLe^a ($\text{Neu}5\text{Ac}\alpha 2\text{-}3\text{Gal}\beta 1\text{-}3(\text{Fuc}\alpha 1\text{-}4)\text{GlcNAc}\beta$).

Встраивание Glyc-PAA(Flu)-PEA в клетки: зависимость от концентрации гликоконъюгата

Исходно был выбран режим инкубирования клеток в присутствии гликоконъюгата при температуре 37°C в течение 60 мин в PBS без сыворотки [16]. В дальнейшем было показано, что низкое содержание (1–2%) FCS не оказывает существенного влияния на встраивание, оставаясь важным для клеточного выживания. Во всех описанных в данной работе экспериментах инкубация клеток с гликоконъюгатами проводилась в PBS с добавлением FCS. В указанном режиме было изучено встраивание в клетки гликоконъюгата $\text{Le}^x\text{-PAA(Flu)-PEA}$ при его разных концентрациях. При увеличении исходного содержания гликоконъюгата в инкубационной смеси в пределах концентраций от 0 до 1000 мкг/мл интенсивность клеточной флуоресценции (I_{fl}^a) возрастила, следовательно, увеличивалось количество гликоконъюгата, удерживаемого на поверхности клеток-мишеней (рис. 1a). На участке кривой для концентраций от 0 до 600 мкг/мл гликоконъюгата данная зависимость имела прямолинейный характер. При использовании более высоких концентраций гликоконъюгата наблюдался выход кривой на плато, что говорит о насыщении процесса встраивания.

С целью дополнительной характеристики встраивания гликоконъюгатов в клетки-мишени было оценено содержание флуоресцентномеченного гликоконъюгата в супернатанте (I_{fl}^f) после завершения инкубации и осаждения клеток центрифугированием (рис. 1б). Исходя из показателей уровня флуоресценции в исходном растворе гликоконъюгата, чье содержание при этом приравнивалось к 100%, и I_{fl}^f после встраивания гликоконъюгата была рассчитана доля гликоконъюгата, ассоциированного с клетками-мишениями (рис. 1в). Она составляла около 20% и оставалась неизменной на промежутке концентраций 0–600 мкг/мл, на что указывает прямолинейная зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации гликоконъюгата на данном участке. При выходе кривой на плато (на участке концентраций от 600 до 1000 мкг/мл) доля встроенного гликоконъюгата

уменьшалась до нескольких процентов, что говорит об ограниченной способности клеток встраивать гликоконъюгат при использовании его в высоких концентрациях.

Жизнеспособность клеток, оцененная до и после встраивания гликоконъюгата, при его исходной концентрации до 100 мкг/мл оставалась практически неизменной, а при увеличении концентрации лишь незначительно уменьшалась. Для дальнейшей работы был выбран диапазон концентрации гликоконъюгатов от 50 до 100 мкг/мл.

Сравнение стандартных частиц Level II, каждая из которых обладает флуоресценцией, эквивалентной 31 тыс. молекул флуоресцеина, с клетками линий K562 и Raji, нагруженных гликоконъюгатом $\text{Le}^x(15\%)-\text{PAA}(\text{Flu}(1\%))-\text{PEA}(5\%)$, позволило рассчитать среднее количество остатков Flu и Le^x , приходящееся на одну клетку, а также приблизительно оценить количество полимерных молекул, связавшихся с одной клеткой (таблица). Зная содержание в полимерной молекуле остатков флуоресцеина и остатков сахара, можно оценить соотношение этих компонентов в гликоконъюгате. Также известно, что в среднем одна молекула гликоконъюгата состоит из 350 повторяющихся звеньев, а на остатки флуоресцеина в молекуле приходится 1 мол. %, т.е. около 3.5 звеньев. Отсюда можно рассчитать количество встроенных молекул гликоконъюгата, приходящихся на одну клетку. Так, при концентрации гликоконъюгата 100 мкг/мл для клеток линий K562 и Raji удельное количество остатков Glyc (Le^x в данном случае) равнялось приблизительно 4 и 8 млн. на клетку, а число ассоциированных с одной клеткой молекул гликоконъюгата – приблизительно 80 и 160 тыс. соответственно. Таким образом, было выявлено различие во встраивании гликоконъюгата в клетки разных линий.

Подбор оптимальных условий встраивания гликоконъюгата в клетки: влияние времени и температуры инкубации

Определение оптимального времени для встраивания гликоконъюгата проводили с использованием клеток линий K562 и Raji. С помощью метода проточной цитофлуориметрии измеряли интенсивность флуоресценции клеток, инкутируемых при 37°C в присутствии гликоконъюгата, на протяжении 75 мин с интервалами 15 мин. Показано, что клетки линии K562 встраивают максимальное количество гликоконъюгата через 45 мин, а клетки линии Raji уже через 30 мин после начала инкубации (рис. 2). Следует отметить, что на временном промежутке 30–60 мин интенсивность флуоресценции существенно не изменялась, при более длительной инкубации можно было наблюдать ее незначительное снижение.

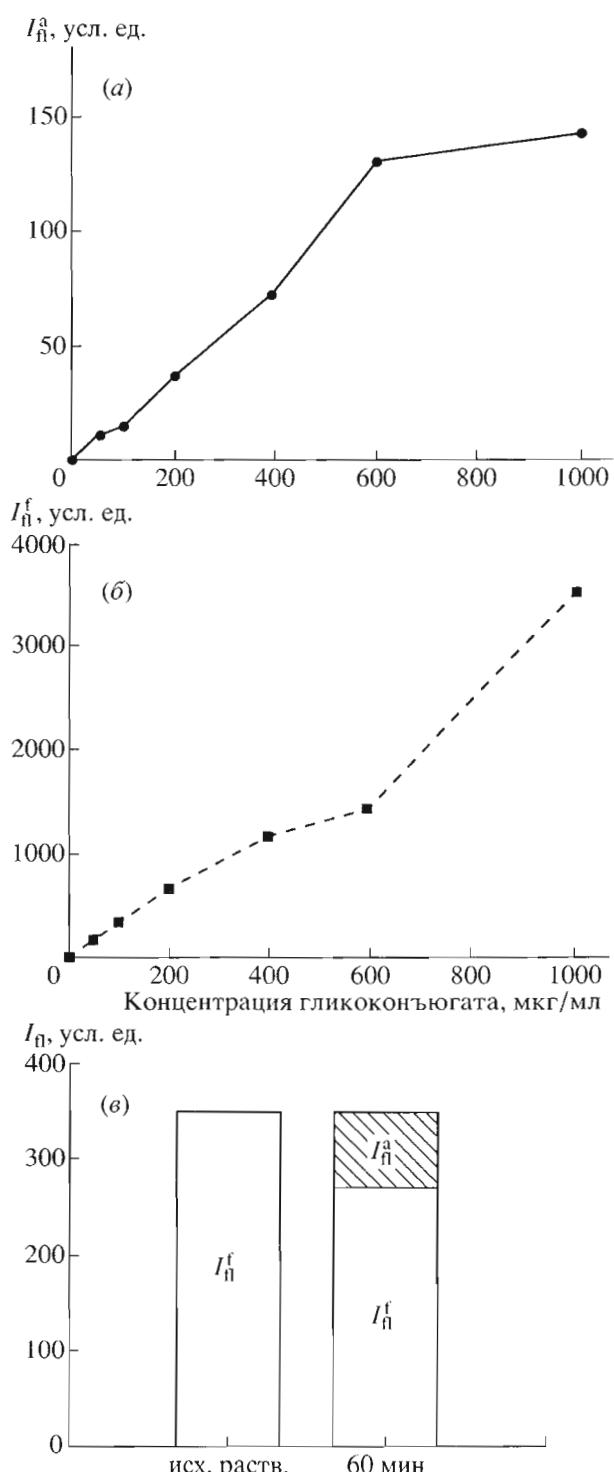


Рис. 1. Встраивание гликоконъюгата Le^x -PAA(Flu)-PEA в клетки K562 (37°C, 60 мин): *а* – зависимость количества ассоциированного с клетками гликоконъюгата (I_f^a) от его концентрации, данные проточной цитофлуориметрии; *б* – количество гликоконъюгата, оставшегося в супернатанте после встраивания (I_f^f), данные спектрофлуориметрии; *в* – соотношение оставшегося в супернатанте и ассоциированного с клетками (заштрихованная доля) гликоконъюгата (исходная концентрация гликоконъюгата 100 мкг/мл).

Количество углеводных остатков (Le^x) и встроенных молекул гликоконъюгата $\text{Le}^x(15\%)\text{-PAA(Flu}(1\%)\text{-PEA}(5\%)$ в расчете на одну клетку линий K562 или Raji

| Параметр | Level II* | Клетки K562 | | | | | Клетки Raji | | | | |
|---|-----------|-------------|-----|------|------|------|-------------|------|------|------|-----|
| Концентрация гликоконъюгата, мкг/мл | | 6 | 12 | 25 | 50 | 100 | 6 | 12 | 25 | 50 | 100 |
| Интенсивность флуоресценции, I_{fl}^a , усл. ед. | 7 | 3.2 | 6.3 | 15.5 | 27.5 | 62.9 | 6.2 | 15.7 | 31.1 | 63.9 | 124 |
| Кол-во остатков Flu на клетку (его эквивалентов на частицу), тыс. | 31 | 14 | 28 | 69 | 122 | 279 | 27 | 70 | 138 | 283 | 549 |
| Кол-во остатков Le^x на клетку, млн. | — | 0.2 | 0.4 | 1 | 1.8 | 4.2 | 0.4 | 1 | 2 | 4.1 | 8.2 |
| Кол-во встроенных молекул гликоконъюгата, тыс. | — | 4 | 8 | 20 | 35 | 80 | 8 | 20 | 39 | 81 | 157 |

* Стандартные частицы Level II, каждая из которых обладает флуоресценцией, эквивалентной 31 тыс. молекул флуоресцеина.

Важный фактор для встраивания гликоконъюгата – температурный режим. При разной температуре мембрана обладает различными физическими свойствами, следовательно, будут отличаться и характеристики встраивания. Было показано, что максимальный уровень встраивания гликоконъюгата в клетки линий K562 и Raji в исследуемом интервале (4–37°C) достигается при 37°C (рис. 3). Наибольшая клеточная выживаемость после обработки была зафиксирована при температуре встраивания 4°C, хотя разница в жизнеспособности, оцененной для встраивания при 4, 20 и 37°C, была незначительной и составляла 5–6%.

Зависимость встраивания гликоконъюгата от содержания в нем липофильного компонента (PEA)

Для изучения роли липофильного компонента в составе гликоконъюгата и выявления его содержания, оптимального для встраивания гликоконъюгата в клеточную мембрану, были синтезированы флуоресцентномеченные гликоконъюгаты, содержащие 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 мол. % остатков фосфатидилэтаноламина. Встраивание в клетки-мишени оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Как видно из рис. 4а, наилучшее встраивание гликоконъюгата, хотя и разное для двух клеточных линий, достигалось при содержа-

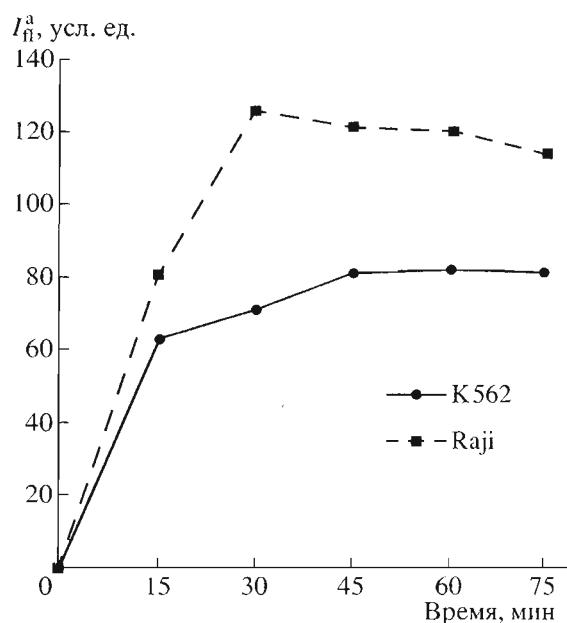


Рис. 2. Динамика встраивания гликоконъюгата $\text{Le}^x\text{-PAA(Flu)-PEA}$ в клетки линий K562 и Raji (исходная концентрация гликоконъюгата 100 мкг/мл, 37°C).

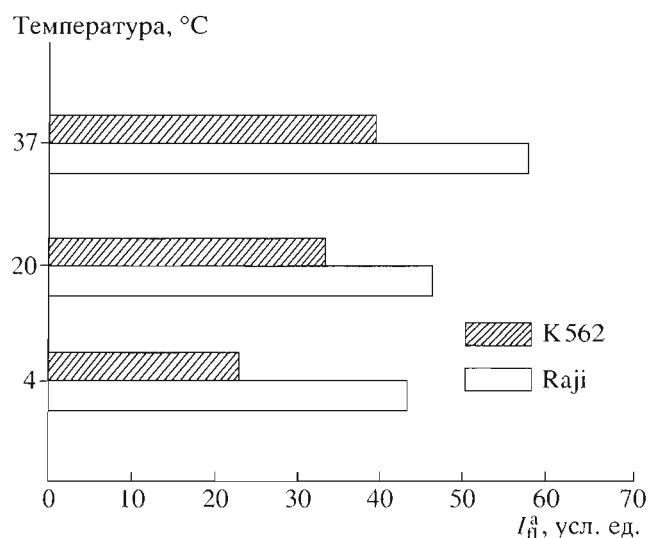


Рис. 3. Зависимость встраивания гликоконъюгата $\text{Le}^x\text{-PAA(Flu)-PEA}$ в клетки линий K562 и Raji от температуры (исходная концентрация гликоконъюгата 100 мкг/мл, 45 мин).

нии PEA, равном 5 мол. %, которое и использовалось в экспериментах (если не указано иначе). При дальнейшем увеличении содержания PEA в гликоконъюгате наблюдалось понижение эффективности встраивания, по-видимому, за счет образования внутренней мицеллы, препятствующей связыванию молекул гликоконъюгата с клеточной мембраной. В то же время аналог, не содержащий PEA, Le^x-PAA(Flu), в мембрану не встраивался (рис. 4 δ), что доказывает необходимость липидного компонента для ассоциации гликоконъюгата с клетками.

Механизм взаимодействия гликоконъюгата с клеточной поверхностью

В данной части работы нашей целью явилось выявление доминирующих взаимодействий в системе мембрана–гликоконъюгат, определяющих прочность связывания и дальнейшее поведение всей системы в целом. Как правило, в подобных системах основополагающими являются два вида взаимодействий: электростатические и гидрофобные. Последние имеют место в случае истинного встраивания, когда остатки PEA входят в липидную фазу мембранны.

Для выполнения поставленной задачи были проведены эксперименты, включающие варьирование таких условий встраивания, как pH инкубационной среды и количество отмывок клеток после инкубирования с гликоконъюгатом. Резкое повышение концентрации ионов H⁺ в PBS при понижении pH до 4 должно было способствовать экранированию поверхностных зарядов, исключая тем самым кулоновские взаимодействия между мембраной и гликоконъюгатом. При этом гликоконъюгат, удерживаемый на мемbrane только электростатически, должен был удаляться в процессе отмывок PBS центрифугированием. Как видно из рис. 5, кратковременная инкубация клеток в среде с pH 4.0, сопровождаемая последующей однократной отмывкой PBS, pH 7.2, приводила к потере ассоциированного с клеточной поверхностью Glyc-PAA(Flu)-PEA, что выражалось в снижении интенсивности клеточной флуоресценции. Гликоконъюгат болееочно удерживался на поверхности клеток линии Raji (интенсивность флуоресценции уменьшалась на 30%) и менееочно на клетках линии K562 (интенсивность флуоресценции уменьшалась более чем на 40%).

С увеличением числа отмывок клеток после инкубирования с гликоконъюгатом также наблюдалось постепенное падение уровня клеточной флуоресценции, что свидетельствует об удалении с поверхности клеток в процессе центрифугирования наиболее слабо связавшегося гликоконъюгата (рис. 5). Следует отметить, что начиная с третьей отмывки интенсивность клеточной флуоресценции значительно не менялась, при этом общее падение уровня флуоресценции совпадало с резуль-

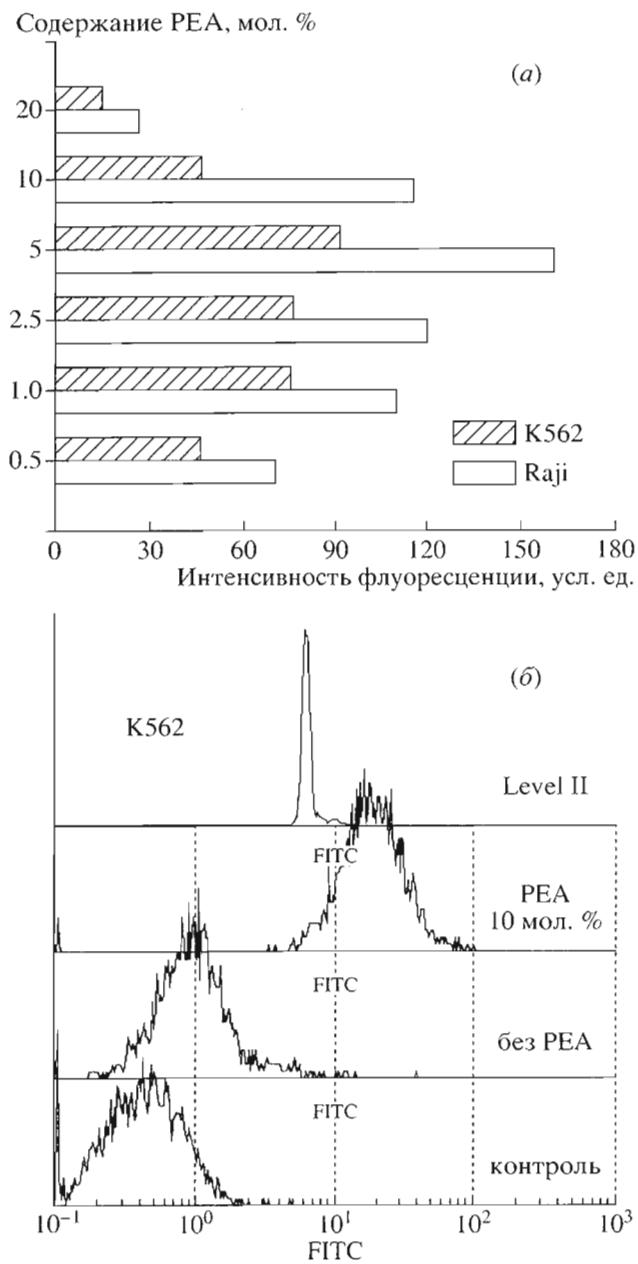


Рис. 4. Эффективность встраивания гликоконъюгата Le^x-PAA(Flu)-PEA в клетки в зависимости от содержания в нем остатков PEA (a) и гистограммы распределения интенсивности клеточной флуоресценции при встраивании в клетки K562 гликоконъюгатов Le^x-PAA(Flu)-PEA и Le^x-PAA(Flu) в сравнении с уровнем флуоресценции стандартных частиц Level II (b) (концентрация гликоконъюгата 100 мкг/мл, 37°C, 45 мин).

татами экспериментов с кратковременным обратным понижением pH и составляло 30–40%, характеризуя таким образом долю гликоконъюгата, удерживаемого на клеточных мембранах электростатическими и, возможно, слабыми гидрофобными взаимодействиями. Такие результаты позволяют предполагать, что удерживаемый

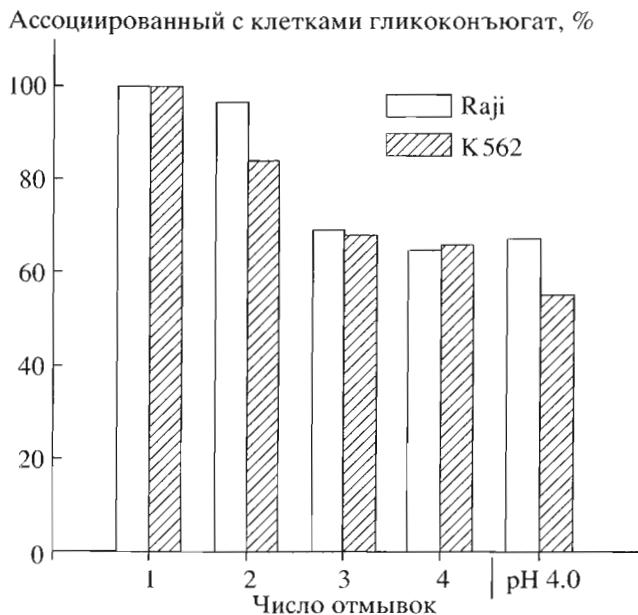


Рис. 5. Изменение I_{fl}^{a} при разном количестве отмывок клеток буфером PBS pH 7.2 после встраивания в них гликоконъюгата $\text{Le}^x\text{-PAA(Flu)}$ -PEA в стандартных условиях (исходная концентрация гликоконъюгата 100 мкг/мл, 37°C, 45 мин) и при кратковременном инкубировании (1 мин) клеток в PBS pH 4.0 после обработки их гликоконъюгатом и последующей двукратной отмычки PBS pH 7.2. За 100% принят средний уровень I_{fl}^{a} после инкубирования клеток с гликоконъюгатом с последующей однократной отмычкой PBS.

гликоконъюгат связан с клеточной поверхностью посредством гидрофобных взаимодействий, при этом количество связавшегося гликоконъюгата зависит от типа клеток и, вероятно, от свойств их мембранны.

Кинетика и механизм элиминации Glyc-PAA(Flu)-PEA с клеточной поверхности

Применение описанного метода модификации клеточной поверхности подразумевает необходимость определения времени, в течение которого гликоконъюгат ассоциирован с клеточной поверхностью. В стандартных тестах по оценке цитотоксичности NK-клеток время инкубации мишней с эффекторами варьирует от 2 до 4 ч. Так, цитотоксический тест с использованием флуоресцентного красителя кальцинина АМ (САМ) занимает 2 ч, тест по выходу лактатдегидрогеназы – 3 ч, тест по выходу радиоактивного хрома – 4 ч. В связи с этим, в данной системе было оценено изменение количества гликоконъюгата, ассоциированного с поверхностью клеток K562 и Raji, в течение нескольких часов. После встраивания гликоконъюгата (см. “Эксперимент. часть”)

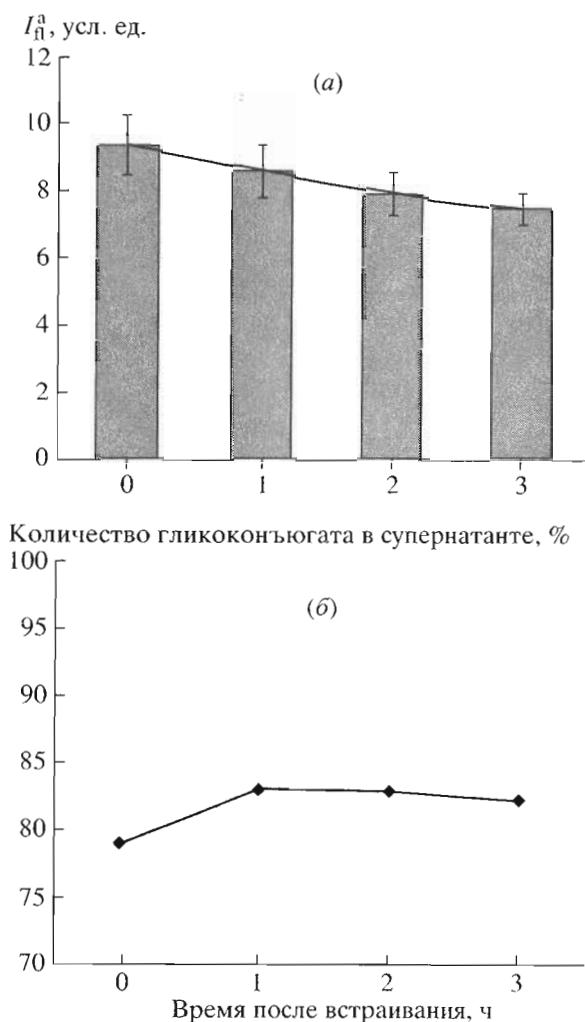


Рис. 6. Динамика элиминации гликоконъюгата $\text{Le}^x\text{-PAA(Flu)}$ -PEA с поверхности клеток K562 в течение 3 ч после его встраивания (исходная концентрация гликоконъюгата 100 мкг/мл, 37°C, 45 мин): *а* – изменение I_{fl}^{a} с течением времени; *б* – изменение I_{fl}^{f} с течением времени, за 100% принято исходное количество гликоконъюгата.

измеряли величину I_{fl}^{a} клеток через определенные промежутки времени. Жизнеспособность клеток, оцененная до и после встраивания, а также после 24-часового культивирования, значительно не изменилась.

Гликоконъюгат присутствовал на поверхности клеток на протяжении 24 ч после обработки (данные не приведены), хотя с течением времени он частично элиминировался с клеточной мембраны, о чем свидетельствует уменьшение величины I_{fl}^{a} во времени. В течение первых 3 ч наблюдалось плавное падение уровня клеточной флуоресценции, которое, однако, не превышало 20% (рис. 6а). Можно предположить два пути элимина-

ции полимерных молекул с клеточной поверхности: сбрасывание во внеклеточную среду и поглощение клетками в процессе эндоцитоза. Для того чтобы оценить долю молекул гликоконъюгата, подвергшихся сбрасыванию, были проанализированы клеточные супернатанты, собранные через различные промежутки времени после встраивания гликоконъюгата. На рис. 6б приведены данные спектрофлуориметрического анализа (I_{fl}) супернатантов клеток, собранных через 1, 2 и 3 ч после обработки гликоконъюгатом и последующей отмычки, пересчитанные в процентах к его исходному количеству. Через 1 ч небольшое количество слабо связавшегося гликоконъюгата попадало в инкубационную среду, далее доля гликоконъюгата в супернатанте не увеличивалась. С учетом того, что при этом наблюдалось снижение I_{fl}^{a} , можно считать, что имел место эндоцитоз полимерных молекул. В простом эксперименте было показано, что интенсивность флуоресценции Glyc-PAA(Flu)-PEA в растворе зависит от кислотности среды. С уменьшением pH среды наблюдалось тушение флуоресценции. Таким образом, снижение со временем уровня флуоресценции клеток, обработанных гликоконъюгатом, может быть объяснено эндоцитозом гликоконъюгата, попаданием его в лизосомы, pH содержимого которых, как известно, значительно ниже физиологического значения 7,2, и, возможно, последующим разрушением лизосомальными ферментами.

На клетках линии K562 гликоконъюгат удерживался в течение более длительного времени по сравнению с клетками линии Raji, хотя клетки K562 обладали меньшей способностью встраивать гликоконъюгат. Таким образом, интенсивность элиминации связана с типом клеток и может зависеть от свойств их клеточных мембран и метаболической активности.

Изучение поверхностной экспрессии антигена CD15 и пространственной доступности углеводных остатков Le^x на клетках-мишених со встроенным гликоконъюгатом

Основной задачей проведения модификации клеток с помощью Le^x-PAA(Flu)-PEA являлось увеличение экспрессии углеводных детерминант на клеточной поверхности. Поскольку трисахарид Le^x кластеризован как лейкоцитарный антиген CD15, была охарактеризована конститутивная экспрессия CD15 на поверхности клеток линий K562 и Raji с помощью моноклональных антител. Было выявлено, что клетки K562 экспрессируют антиген CD15 в небольшом количестве на своей поверхности, в отличие от клеток Raji, для которых было показано отсутствие такой экспрессии (рис. 7). С целью выявления пространственной доступности Le^x на поверхности модифицированных с помощью Le^x-PAA(Flu)-PEA кле-

ток Raji и K562, клетки после встраивания гликоконъюгата были обработаны мечеными фикоэритрином антителами к антигену CD15. Встраивание Le^x-PAA(Flu)-PEA приводило к резкому увеличению связывания антител с клетками, что свидетельствует об увеличении количества Le^x, представленного на клеточной поверхности (рис. 7а (D, G)). В свою очередь доступность трисахарида Le^x для связывания с антителами предполагает пространственную доступность углеводных детерминант для взаимодействия с рецепторными структурами других клеток, в частности NK-клеток. Аналогичные результаты были получены при встраивании гликоконъюгата, в состав которого не входила флуоресцентная группировка, с использованием меченых FITC антител к CD15 (рис. 7б).

Оценка опосредованной NK-клетками цитотоксичности с использованием модифицированных клеток-мишеней

Разработанная модельная система далее была применена для оценки влияния углеводов, представленных на поверхности клеток-мишеней, на цитотоксическую активность NK-клеток человека. Модификации с помощью гликоконъюгата Le^x-PAA(Flu)-PEA были подвергнуты клетки линии K562, стандартные мишени NK-клеток, чья чувствительность к действию натуральных киллеров частично связана с отсутствием поверхностной экспрессии молекул МНС класса I. Контролем в цитотоксическом teste служили необработанные клетки-мишени. В качестве эффекторных клеток использовали периферические мононуклеары (ПМН) крови здорового донора, лишенные субпопуляции прилипающих клеток и В-клеток. Предварительно проводили фенотипирование ПМН с помощью антител к антигенам Т-клеток (CD3, CD4 и CD8), NK-клеток (CD16) и В-клеток (CD19). Таким образом, контролировали фенотип клеток крови доноров и использовали в экспериментах эффекторные клетки только здоровых индивидуумов, у которых соотношение различных клеточных популяций не выходило за пределы среднестатистической нормы.

Оценку цитотоксичности проводили с применением флуоресцентных красителей кальцеин AM (CAM) и этидиум гомодимер-1 (Eth1) в teste продолжительностью 2 ч. CAM расщепляется внутриклеточными эстеразами с высвобождением высокоэффективного флуорофора кальцеина и, таким образом, может служить красителем для живых клеток. Eth1 окрашивает перфорированные клетки, связываясь с ядерной ДНК. При различных соотношениях мишеней и эффекторов было показано, что трисахарид Le^x обладает положительным влиянием на цитолитическую активность NK-клеток человека (рис. 8). При этом

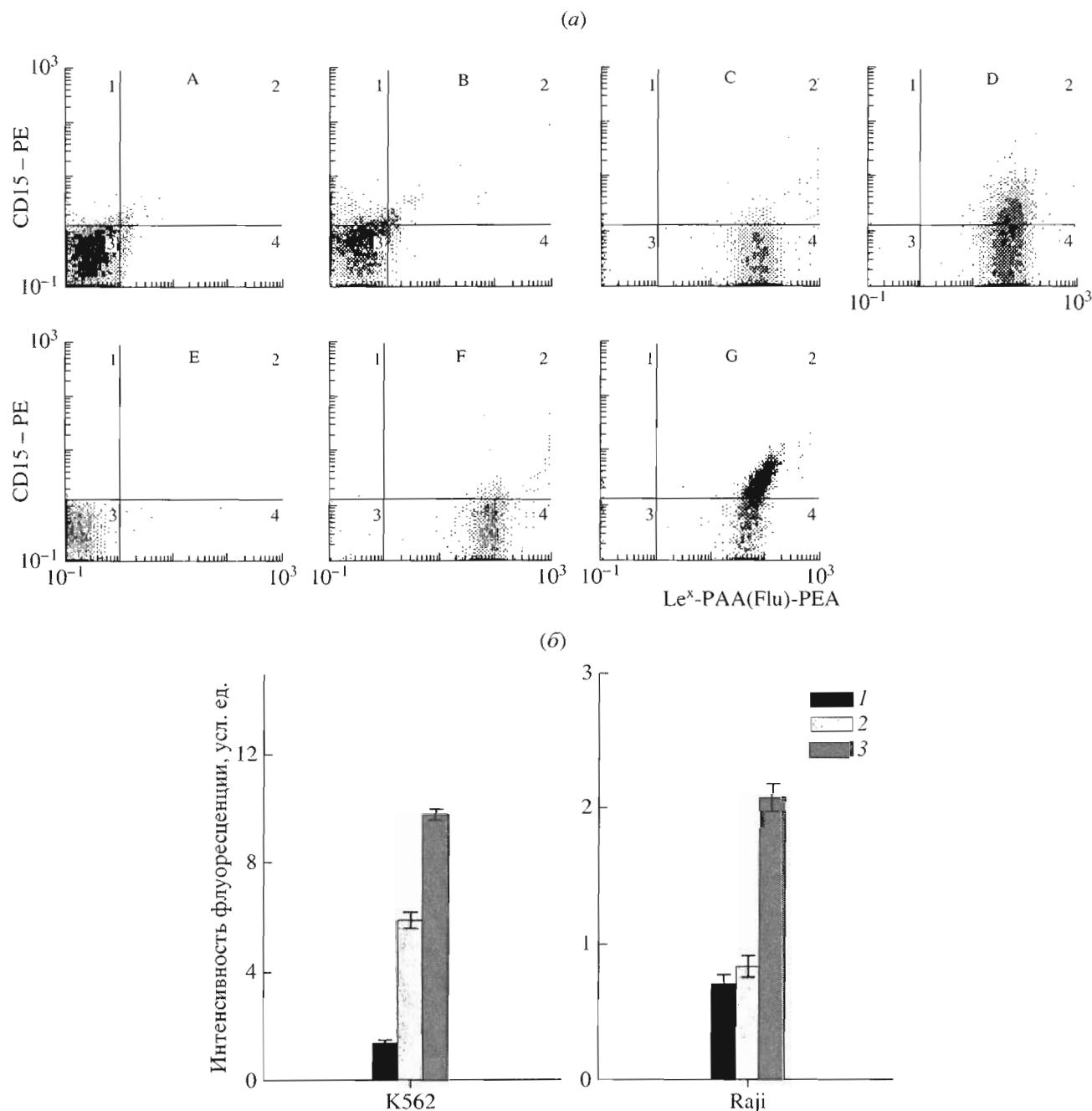


Рис. 7. Определение антигена CD15, представленного на поверхности клеток линий K562 и Raji: *а* – двухпараметрические гистограммы распределения количества клеток линий K562 (A–D) и Raji (E–G) со встроенным гликоконъюгатом $\text{Le}^x\text{-PAA(Flu)-PEA}$ (C, D для K562; F, G для Raji) и в присутствии антител анти-CD15, меченные PE (B, D для K562; E, G для Raji), по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции Flu, по оси ординат – интенсивность флуоресценции PE; *б* – оценка экспрессии Le^x на поверхности клеток K562 и Raji до (2) и после встраивания гликоконъюгата $\text{Le}^x\text{-PAA-PEA}$ (3) с помощью антител анти-CD15, меченные FITC, в качестве контроля использовали необработанные клетки (1).

модификация клеток с помощью гликоконъюгатов, содержащих такие сахарины, как SiaLe^a и B_{di} , в качестве углеводных лигандов, не приводила к изменению цитотоксичности (данные не приведены).

Дополнительно были проведены эксперименты, в которых в качестве клеток-эффекторов использовали периферические мононуклеары до-

нов, у которых отсутствовали (либо имелось незначительное количество) клетки $\text{CD16}^+\text{CD3}^-$, представляющие популяцию натуральных киллеров. Фактически, в состав ПМН таких доноров входили лишь В- и Т-лимфоциты (моноциты были удалены прилипанием). Было показано отсутствие какого-либо влияния использованных оли-

госахаридов на активность данной клеточной популяции ПМН. Эти данные свидетельствуют о том, что обнаруженный в цитотоксическом тесте позитивный эффект сахарида Le^x связан с цитотоксичностью натуральных киллеров и не обусловлен Т-клетками.

Таким образом, в настоящей работе был развит предложенный нами ранее [16] подход к модификации углеводного состава поверхности клеток-мишеней, который заключается во встраивании в их мембранны синтетических гликоконъюгатов и позволяет насытить клеточную поверхность углеводами определенного вида. Структура использованных для данной цели гликоконъюгатов определялась следующими соображениями. Наличие в гликоконъюгате нескольких углеводных цепей способствует мультивалентному взаимодействию, необходимому для углеводопосредованного клеточного узнавания, а гидрофобные участки обеспечивают возможность закрепления молекул гликоконъюгата в плазматической мембране. В то время как мономерные гликосфинголипиды или их синтетические аналоги могут при встраивании распределяться в мемbrane равномерно, в нашем случае было гарантировано кластерное распределение Le^x . Кроме того, на каждый встроенный с помощью Glyc-PAА-РЕА в мембрану липофильный остаток приходится несколько остатков сахарида, что минимизирует влияния гликоконъюгата на свойства мембранны. В работе были подобраны такие концентрации гликоконъюгатов, при которых экспонирование на клеточной поверхности кластеров углеводных детерминант было количественно сравнимо с экспрессией физиологических рецепторов на поверхности клетки-мишени (40–150 тыс.). Показано, что этот процесс проходил без заметного нарушения клеточной физиологии, встраивание гликоконъюгатов не изменяло клеточной жизнеспособности. Преимуществом созданной модельной системы является простота процедуры встраивания и скорость ее постановки. Так, процесс обработки клеток гликоконъюгатом длится не более часа. Были подобраны оптимальные условия для встраивания гликоконъюгатов в плазматическую мембрану клеток-мишеней и установлено оптимальное содержание липофильной составляющей гликоконъюгата (5 мол. % РЕА), которое приводило к максимальному уровню встраивания молекул гликоконъюгата. Была прослежена “судьба” полимерных молекул и их время жизни на клеточной поверхности. Продемонстрирована пространственная доступность углеводных детерминант для межклеточного взаимодействия при встраивании как флуоресцентномеченых, так и не содержащих Flu гликоконъюгатов. Доказано, что гликоконъюгат присутствует на клеточной поверхности в течение 24 ч, причем на протяжении цитотоксического теста (3 ч) количество ас-

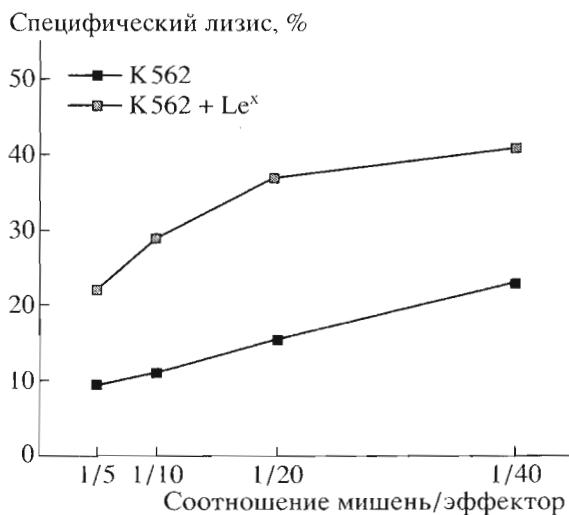


Рис. 8. Влияние трисахарида Le^x на цитотоксическую активность клеток-эффекторов, оцененное цитофлуориметрическим методом с использованием флуоресцентных красителей Eth1 и CAM. В качестве контроля использовали клетки, не модифицированные гликоконъюгатом.

социированного с мембраной гликоконъюгата изменяется весьма незначительно.

С помощью данной модели было показано, что встраивание трисахарида Le^x положительно воздействует на цитотоксическую активность NK-клеток, входящих в состав периферических мононуклеаров человека. Увеличение цитотоксичности может быть связано 1) с усилением межклеточной адгезии, 2) со специфическим распознаванием углеводной детерминантами NK-клетками. Le^x и его сапирированное производное SiaLe^x, известные также как антигены CD15 и CD15s соответственно, являются группоспецифическими углеводными антигенами системы Lewis и были впервые описаны как эмбриональные антигены, появляющиеся в определенных стадиях имплантации зародыша [17]. Эти антигены являются биологически значимыми как на ранних, так и на зрелых стадиях развития организма позвоночных. Le^x и SiaLe^x экспрессируются в составе гликопротеинов или гликосфинголипидов на гематopoэтических стволовых клетках, миелоидных предшественниках, гранулоцитах и моноцитах и в основном принимают участие в межклеточной адгезии [12–13, 17]. Лимфоциты, как правило, не экспрессируют эти антигены, в то же время SiaLe^x присутствует на NK-клетках и незрелых лимфоидных клетках [18]. SiaLe^x – лиганд селектинов и участвует в рециркуляции лимфоцитов и адгезии нейтрофилов к эндотелию. Опухолевые новообразования, в частности опухоли желудочно-кишечного тракта и легочные adenокарциномы, часто сопровождаются повышенной или *de novo* экспрессией Le^x и SiaLe^x, что, как правило, соотносится с

определенным типом опухолевого распространения, метастазирования и плохим прогнозом [13, 19]. Предполагается, что высокий потенциал метастазирования таких опухолей связан с увеличенной селективнопосредованной адгезией к эндотелию [20]. Le^x и родственные сахарины вовлечены во взаимодействия NK-клеток с мишениами. Установлена корреляция между высокой экспрессией этого антигена на опухолевых клетках и их способностью образовывать агрегаты с NK-клетками [11]. В последнее время было показано, что атаке NK-клеток подвергаются опухолевые клетки с высоким уровнем экспрессии SiaLe^x, при этом чувствительность опухолевых клеток к NK-клеткам может сильно зависеть от плотности экспрессии этого антигена [3]. Существуют данные, что ассоциированные с CD15 углеводные антигены в составе полилактозаминных N-цепей являются лигандами для молекул CD2, а моноклональные антитела к CD15 могут ингибировать опосредованный NK-клетками киллинг клеток K562 [21]. Возможно, влияние Le^x на цитотоксическую активность NK-клеток находится в зависимости от способа его представления и количества на клеточной поверхности.

Использование описанной выше экспериментальной системы позволило нам получить данные, свидетельствующие в пользу того, что Le^x служит структурой, актуальной для распознавания клеток-мишеней NK-клетками, усиливающей их цитотоксическое действие.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Гликоконъюгаты. В работе использованы гликоконъюгаты типа Glyc-PAA-PEA: Le^x(15%)-PAA-PEA(5%), B_d(15%)-PAA-PEA(5%), SiaLe^a(15%)-PAA-PEA(5%) (знаком % здесь обозначается молярный процент, соответствующий мольной доле модифицированных лигандом акрилатных звеньев); флуоресцентномеченные производные гликоконъюгатов типа Glyc-PAA(Flu)-PEA, содержащие 15 мол. % Le^x, 1 мол. % Flu и 5 мол. % PEA, если не указано иначе; а также не содержащий PEA гликоконъюгат Le^x(15%)-PAA(Flu(1%)). Спайсированные сахарины получены от фирмы Syntesome GmbH (Мюнхен, Германия). Полимерные неогликоконъюгаты были получены с использованием модифицированного метода [14].

Клеточные линии и их культивирование. В работе использовали клетки человеческой эритролейкемической линии K562 (стандартные клетки-мишени натуральных киллеров) и В-лимфомы Бёркитта Raji (слабочувствительные к действию NK-клеток). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 50 мкг/мл гентамицина, 1 мМ пирувата натрия (Flow Laboratories, Великобритания), 2 мМ L-глутамина и 0.05 мМ 2-меркаптоэтанола (Sigma, США) в присутствии эмбри-

нальной телячьей сыворотки (FCS), в концентрации 5% для клеток линии K562 и 10% для клеток линии Raji, во влажной атмосфере с 5% CO₂ при температуре 37°C.

Встраивание гликоконъюгатов в клетки. Для модификации с помощью гликоконъюгатов использовали клетки K562 и Raji в фазе логарифмического роста. Встраивание гликоконъюгатов в клетки проводили в PBS (фосфатный буфер (0.05 M), NaCl (0.15 M), pH 7.2), содержащем 1% FCS. Предварительно клетки двукратно отмывали центрифугированием с помощью PBS (200 g, 10 мин) в объеме 3 мл и затем инкубировали в концентрации 2 × 10⁶ клеток/мл, сопровождая периодическим перемешиванием, в течение 45 мин с гликоконъюгатом (100 мкг/мл) при 37°C, если не указано иначе. Затем клетки дважды отмывали как описано выше. Клеточную жизнеспособность до и после встраивания оценивали по включению красителя трипанового синего.

Для выявления оптимальных условий встраивания Glyc-PAA(Flu)-PEA проводили при разной температуре (4, 20, 37°C), разном времени инкубирования (15, 30, 45, 60, 75 мин) с использованием концентраций гликоконъюгата от 6 до 1000 мкг/мл. Для изучения зависимости встраивания гликоконъюгата от содержания в нем остатков PEA использовали неогликоконъюгаты с содержанием PEA 0.5; 1; 2.5; 5; 10 и 20 мол. % и без остатков PEA. Встраивание проводили в стандартных условиях при концентрации гликоконъюгата 100 мкг/мл. Для подтверждения пространственной доступности углеводных детерминант использовали гликоконъюгат Le^x-PAA-PEA.

Иммунофенотипирование клеток. Уровень экспрессии сахарида Le^x на поверхности контрольных и модифицированных гликоконъюгатами клеток-мишней определяли методом иммунофлуоресценции с помощью антител к антигену CD15, меченых флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (Sigma, США) и фикоэритрином (PE) (Caltag Lab., Канада). Иммунофенотипирование клеток периферической крови человека проводили с использованием антител к антигенам CD3, CD4, CD8, CD19 и CD16, меченых FITC (Caltag Lab., Канада). Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток (не менее 200 тыс.) проводили в PBS, содержащем 1% FCS, в объеме 100 мкл. Для этого к предварительно отмытым клеткам добавляли антитела в соответствующем титре (1 : 100 для всех антител), затем клеточную суспензию инкубировали в течение 40 мин при 4°C с последующей двукратной отмывкой. Далее проводили цитофлуориметрический анализ.

Проточная цитометрия. Анализ флуоресценции клеток (не менее 5000) проводили на проточном цитофлуориметре EPICS "ELITE" (Coulter Electronics Inc., США), оборудованном лазером

CYONICS (Uniphase, США). Возбуждение флуоресценции проводили при длине волны 488 нм и мощности луча 15 мВт, регистрацию флуоресценции – при 525 (FITC, Flu, CAM) и 625 нм (Eth1). 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-PAA(Flu)-PEA, связавшихся с клетками, оценивали в сравнении с флуоресценцией микросфер IMMUNO-BRIT Level II (Coulter Electronics Inc., США), содержащих 31 тыс. эквивалентов флуоресцеина. Удельное количество ассоциированных с клетками остатков олигосахарида рассчитывали исходя из мольных соотношений Flu и Glyc.

Спектрофлуориметрия. Интенсивность флуоресценции супернатанта регистрировали на спектрофлуориметре Hitachi F-4000 (Япония) в кварцевых кюветах размером 5 × 5 мм при ширине щелей монохроматоров 5 нм. Измерения проводили в 3 повторах и рассчитывали среднее значение для каждой точки. Возбуждение флуоресценции вели при длине волны 490 нм, испускание – при 510 нм.

Выделение эффекторов. В качестве источника NK-клеток использовали кровь здоровых доноров, полученную в результате пункции вены. ПМН выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Для этого кровь набирали в коническую пробирку с гепарином (10 Ед/мл крови) (Sigma, США), разводили в 2 раза PBS и насыщали на смесь фикколл-верографин с плотностью 1.078 г/мл. Пробирку с градиентом плотности центрифугировали при комнатной температуре 20 мин, 1000 g. ПМН собирали из интерфазы по всей площади сечения пробирки, полученную взвесь разбавляли не менее чем 4-кратным избытком PBS, тщательно перемешивали и центрифugировали однократно 15 мин, 300 g и два раза по 10 мин, 150 g, затем переводили в питательную среду, содержащую 2% FCS.

Для отделения прилипающих клеток дважды проводили следующую процедуру. На дно пластиковой чашки Петри диаметром 100 мм наливали суспензию ПМН и инкубировали ее при температуре 37°C в течение 40 мин во влажной атмосфере с 5% CO₂. После этого осторожно собирали клетки, не прилипшие к пластику, и повторяли процедуру. Далее производили подсчет количества клеток.

Цитотоксический тест. Для постановки цитотоксического теста использовали необработанные и модифицированные с помощью глико-

конъюгатов клетки K562 в качестве клеток-мишеней и мононуклеары периферической крови человека без популяции прилипающих клеток в качестве эффекторов. Цитотоксичность оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием набора для цитотоксических тестов (L-3224 "Live / Dead", Molecular Probes, США), содержащего флуоресцентные красители для живых и мертвых клеток-мишеней, кальцеин АМ (CAM) и этидиум гомодимер-1 (Eth1) соответственно. Предварительно проводили окраску живых клеток-мишеней. Клеточную суспензию (1 млн./мл) инкубировали в присутствии 40 нМ CAM при комнатной температуре в течение 15 мин с последующей двукратной отмыvkой PBS. Реакцию цитотоксичности проводили в питательной среде с 2% FCS в конечном объеме 400 мкл при 37°C в атмосфере с 5% CO₂, инкубируя клетки-мишени (70 тыс.) и клетки-эффекторы в определенных соотношениях в течение 2 ч. Затем смесь эффекторов и мишеней в течение 15 мин обрабатывали красителем Eth1 (100 нМ) при комнатной температуре для выявления мертвых клеток. Цитотоксичность оценивали с использованием двухпараметрического анализа по соотношению живых (окрашенных только CAM) и мертвых (окрашенных обоими красителями) клеток-мишеней в регионах с заданными границами.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 01-04-48693). Авторы выражают благодарность за участие в проведении работы Вильяму Тэлфорду (Национальный институт здоровья США).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Trincheri G. // *Adv. Immunol.* 1989. V. 47. P. 187–377.
2. Ljungren H.-G., Karre K. // *Immunol. Today.* 1990. V. 11. P. 237–244.
3. Ohyama C., Kanto S., Kato K., Nakano O., Arai Y., Kato T., Chen S., Fukuda M.N., Fukuda M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 13789–13794.
4. Artrip J.H., Kwiatkowski P., Michler R.E., Wang S.-F., Tuqlea S., Ankersmit J., Chisholm L., McKenzie I.F.C., Sandrin M.S., Itescu S. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 10717–10722.
5. Sol M.A., Vacaresse N., Lule J., Davrinche C., Gabriel B., Teissie J., Ziegler A., Thomsen M., Benoist H. // *Tissue Antigens.* 1999. V. 54. P. 113–121.
6. Inverardi L., Clissi B., Stolzer A.L., Bender J.R., Sandrin M.S., Pardi R. // *Transplantation.* 1997. V. 63. P. 1318–1330.
7. Ogata S., Maimonis P.J., Itzkowitz S.H. // *Cancer Res.* 1992. V. 52. P. 4741–4746.
8. Yoshimura M., Ihara Y., Ohnishi A., Ijuhin N., Nishiura T., Kanakura Y., Matsuzawa Y., Taniguchi N. // *Cancer Res.* 1996. V. 56. P. 412–418.
9. Blottiere H.M., Burg C., Zennadi R., Perrin P., Blanchardie P., Bara J., Meflan K., Le Pendu J. // *Int. J. Cancer.* 1992. V. 52. P. 609–618.

10. Ahrens P.B. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 385–391.
11. Zarcone D., Tilden A.B., Friedman H.M., Grossi C.E. // Cancer Res. 1987. V. 47. P. 2674–2682.
12. Fukushima K., Hirota M., Terasaki P.I., Wakisaka A., Togashi H., Chia D., Suyama N., Fukushima Y., Nudelman E., Hakomori S. // Cancer Res. 1984. V. 44. P. 5279–5285.
13. Shitara K., Hanai N., Yoshida H. // Cancer Res. 1987. V. 47. P. 1267–1272.
14. Bovin N.V., Korchagina E.Yu., Zemlyanukhina T.V., Byramova N.E., Galanina O.E., Zemlyakov A.E., Ivanov A.E., Zubov V.P., Mochalova L.V. // Glycocon. J. 1993. V. 10. P. 142–151.
15. Hakomori S. // Biochem. Soc. Trans. 1993. V. 21. P. 583–595.
16. Коваленко Е.И., Саблина М.А., Хайдуков С.Б., Хироева Е.В., Бовин Н.В. // Биоорган. химия. 1998. V. 24. P. 224–228.
17. Solter D., Knowles B.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. P. 5565–5569.
18. Ohmori K., Yoneda T., Ishihara G., Shigeta K., Hirashima K., Mutsuyuki K., Itai S., Sasaoki T., Arai S., Arita H., Kannagi R. // Blood. 1989. V. 74. P. 255–261.
19. Konno A., Hoshino Y., Terashima S., Motoki R., Kawaguchi T. // Clin. Exp. Metastasis. 2002. V. 19. P. 61–70.
20. Takada A., Ohmori K., Yoneda T., Tsuyuoka K., Hasegawa A., Kiso M., Kannagi R. // Cancer Res. 1993. V. 53. P. 354–361.
21. Warren H., Altin J.G., Waldron J.C., Kinnear B.F., Parish C.R. // J. Immunol. 1996. V. 156. P. 2866–2873.

Modification of the Target Cell Surface with Lipophilic Glycoconjugates and Interaction of the Modified Cells with Natural Killer Cells

**E. I. Kovalenko[#], E. V. Khirova, I. M. Molotkovskaya, T. V. Ovchinnikova,
M. A. Sablina, A. M. Sapozhnikov, S. V. Khaidukov, and N. V. Bovin**

[#] Phone: +7 (095) 330-4011, e-mail: kovalen@ibch.ru

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

An experimental model system involving the modification of carbohydrate composition of the target cell surface with neoglycolipids was developed for studying the role of surface carbohydrates of target cells in the NK-cell-mediated cytotoxicity. The polymeric glycoconjugates of the Glyc–PAA–PEA and Glyc–PAA(Flu)–PEA types (where Glyc was an oligosaccharide residue, PAA poly(acrylamide) polymer, and PEA the phosphatidylethanolamine residue, and Flu fluorescein residue) capable of incorporation into the cell membrane were synthesized. The optimum structures of neoglycoconjugates and conditions for their incorporation into K562 and Raji cell lines, which differ in their sensitivity to the NK-cell-mediated lysis were selected. The mechanism of association of glycoconjugates with the plasma cell membrane and the kinetics of their elimination from the cell surface were investigated using the fluorescent-labeled Glyc–PAA(Flu)–PEA derivatives. The spatial accessibility of the carbohydrate ligands for the interaction with human NK cells was demonstrated. The target cells modified with the Le^x trisaccharide were shown to be more sensitive to the cytotoxic effect of human NK cells than the intact cells. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: cytotoxicity, Le^x trisaccharide, neoglycoconjugates, NK cells