

Антипролиферативная активность гликопротеидов хлопчатника

З. С. Хашимова

Институт биоорганической химии им. А. С. Садыкова АН Республики Узбекистан
Пр. Х. Абдуллаева, 83, Ташкент, 700143, Республика Узбекистан

Установлена антипролиферативная активность экстенсина- (ЭПБ) и лектиноподобных (ЛПБ) белков, выделенных из хлопчатника, по включению ³H-тимидина в клетках суспензионной культуры хлопчатника. Показано зависящее от времени инкубации ингибиторное действие ЭПБ и ЛПБ.

Введение. Гликопротеиды привлекают внимание исследователей в связи с их участием во многих важных для клетки и организма процессах узнавания благодаря их большой информационной емкости, многообразию пространственной структуры олигосахаридных фрагментов [1, 2] и, как следствие, широкому спектру биологической активности. Известно участие лектинов и лектиноподобных белков (ЛПБ) в агглютинации клеток крови, агрегации и адгезии нормальных и опухолевых клеток. Показаны их митогенные и цитотоксические свойства, связанные с действием этих белков как на мембранном, так и на внутриклеточном уровнях [1, 3, 4].

Если для лектинов найден механизм митогенной стимуляции лимфоцитов, включающий связывание с углеводными компонентами клеточных рецепторов, которые запускают каскад внутриклеточных процессов, затрагивающих и ядро [5], а также механизм цитотоксического действия некоторых растительных лектинов [1], то для экстенсинаподобных белков (ЭПБ) таких сведений не имеется. Представления об ЭПБ постоянно углубляются и претерпевают изменения: от представлений о белках, участвующих в построении клеточной стенки, а также в растяжении ее [6], к представлениям о белках, проявляющих полифункциональный характер действия. Так, содержание экстенсина резко возрастает под действием низких температур, этилена, при раневом и инфекционном по-

ражении, что позволяет говорить о его защитных функциях [7–10].

Одним из подходов к оценке биологической активности, а также определению характера действия новых белковых веществ, в том числе ЛПБ и ЭПБ, является изучение уровня синтеза важнейших клеточных биополимеров — нуклеиновых кислот и белков.

В связи с этим в данной работе было изучено действие ЛПБ и ЭПБ на уровень пролиферации клеток хлопчатника.

Материалы и методы. Лектиноподобные белки из семян хлопчатника были выделены нами ранее солевой экстракцией с последующим ступенчатым высаливанием сульфатом аммония. Фракция, полученная между 60 и 80 % насыщения, обозначена как общие ЛПБ_{60–80} [11].

ЭПБ были выделены из суспензионной культуры хлопчатника экстракцией 0,2 М СаСl₂ водонерастворимого материала с последующей очисткой на колонке с КМ-целлюлозой [11].

Гемагглютинирующую активность определяли с использованием 2 % суспензии эритроцитов человека по стандартной методике [12].

Суспензионная культура клеток хлопчатника линии Кокер любезно предоставлена И. Р. Григиной (Институт генетики АН РУ).

Клетки засевали по 100 тыс. на лунку, в культуральную среду вносили белки в дозах от 10 до 100 мкг в лунку и инкубировали при температуре 28 °С. Время контакта клеток с белками — ЛПБ, ЭПБ, конканавалином-А (Con-A) составляло

6, 24 и 30 ч соответственно, после чего на 1 ч вводили ^3H -тимидин (10 мкКи на лунку) в объеме 10 мкл.

Для оценки уровня включения радиоактивности из лунок отбирали ресуспендированную клеточную взвесь и переносили на GFC-фильтры, фиксировали 5 %-м раствором ТХУ, промывали дистиллированной водой, высушивали спиртом и просчитывали в 5 мл сцинтиллятора (РРО-РОРОР в толуоле) на жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Все опыты, включая контрольные, проводили в трех повторностях.

Содержание общих сахаров в белках определяли спектрофотометрически с антрон-сернохлоридным реагентом, а также обработкой геля Соп-А—пероксидазой с последующим окрашиванием диаминобензидином [13].

Содержание белка определяли по методу Лоури [14].

Результаты и обсуждение. Ранее в нашей лаборатории из хлопчатника выделены ЛПБ₆₀₋₈₀ и ЭПБ, впоследствии охарактеризованные электрофоретически в системе Лэммли с 0,1 %-м додецилсульфатом натрия (ЛПБ₆₀₋₈₀) и в 7,5 %-м ПААГ с 8 М мочевиной (ЭПБ) [13, 15—17]. Присутствие углеводов в ЛПБ₆₀₋₈₀ и ЭПБ установлено обработкой электрофоретических гелей Соп-А—пероксидазой с последующим окрашиванием диаминобензидином [13, 15]. Определено также количественное содержание общих сахаров спектрофотометрически с использованием антрон-сернохлоридного реагента. Для ЛПБ и ЭПБ эта величина составляет 8—11 и 60—65 % от белковой массы соответственно.

ЛПБ₆₀₋₈₀ вызывали агглютинацию эритроцитов человека, причем преимущественно I и II групп крови; ЭПБ подобной активностью не обладали. В то же время на частично синхронизированной,

высокопролиферирующей культуре клеток меланомы мышей В-16 (КМЛ) действие ЭПБ приводило к агрегации клеток.

Биологическую активность изучали на суспензионной культуре хлопчатника линии Кокер, оценивая уровень пролиферации клеток по включению ^3H -тимидина. Для этого клетки засеивали по 100 тыс. в лунку, вводили белки в дозах от 10 до 100 мкг на лунку и инкубировали в течение 6, 24 и 30 ч при температуре 28 °С. Контролем служили клетки без воздействия белков и при расчете контроль принят за 100 %.

Как видно из табл. 1, ЭПБ снижает уровень включения ^3H -тимидина в клетки хлопчатника при дозе белка 25 мкг и существенно не меняется при увеличении дозы до 100 мкг, причем антипролиферативная активность наблюдается при контакте препарата с клетками и спустя 6 ч. ЛПБ вызывает некоторое повышение включения ^3H -тимидина при дозе 100 мкг. Аналогичный эффект наблюдается и под действием Соп-А, но при дозе 10 мкг. Однако при контакте клеток с препаратами в течение суток пролиферативная активность клеток существенно снижается, составляя для ЭПБ 55 % при дозе 25 мкг белка, и практически не меняется при повышении дозы до 100 мкг. ЛПБ проявляют аналогичный эффект при дозе 50 мкг (табл. 2).

Интересно отметить, что Соп-А, известный митоген лимфоцитов человека и животных, но токсичный для некоторых видов животных клеток [1], ингибирует включение метки в ДНК клеток хлопчатника в той же степени, что и ЭПБ, но при меньшей дозе (10 мкг), т. е. проявляет антипролиферативную активность в растительных клетках хлопчатника (см. табл. 2). Ранее нами было показано, что такой же характер действия ЭПБ, выделенного из суспензионной культуры хлопчатника, проявлялся относительно животных клеток миело-

Таблица 1
Действие лектино-и экстензиноподобных белков хлопчатника на пролиферацию клеток хлопчатника*

Образец	Включение ^3H -тимидина при дозе (мкг) белка в пробе, %			
	10	25	50	100
ЭПБ	—	87,8±1,2	—	76,9±1,6
ЛПБ ₆₀₋₈₀	—	—	110,4±4,2	—
Соп-А	119,2±5,4	—	—	—

*Данные приведены через 6 ч после инкубации с образцами.

Таблица 2
 Действие лектино- и экстензиноподобных белков на пролиферацию клеток хлопчатника*

Образец	Включение ³ H-тимидина при дозе (мкг) белка в пробе, %			
	10	25	50	100
ЭПБ	—	55,1±1,3	—	58,4±2,3
ЛПБ ₆₀₋₈₀	—	—	68,9±3,1	—
Соп-А	51,5±2,0	—	—	—

*Данные приведены через 24 ч после инкубации с образцами.

Таблица 3
 Действие лектино- и экстензиноподобных белков на пролиферацию клеток хлопчатника*

Образец	Включение ³ H-тимидина при дозе (мкг) белка в пробе, %			
	10	25	50	100
ЭПБ	—	112,9±4,2	—	90,3±2,5
ЛПБ ₆₀₋₈₀	—	—	91,8±2,5	—
Соп-А	97,7±3,1	—	—	—

*Данные приведены через 30 ч после инкубации с образцами.

цитов и эритробластов человека К-562; при низкой дозе уровень включения тимидина был близок к контрольному, но при повышении дозы степень ингибирования возрастала [18].

С другой стороны, влияние ЛПБ, выделенного из семян хлопчатника, носит противоположный характер в различных клеточных системах. Так, если в клетках человека (лимфоциты) и животных (миелоциты мыши) эти белки проявляли себя как митогены [18], то в гомологичной системе (суспензионная культура хлопчатника) вызывали ингибирование синтеза ДНК.

По-видимому, эти различия обусловлены спецификой взаимодействия ЭПБ и ЛПБ с клеточными рецепторами гомологичных и гетерологичных систем.

Из данных табл. 3 следует, что уровень включения ³H-тимидина возрастает в клетках хлопчатника через 30 ч инкубации.

Исходя из полученных данных можно предположить, что цитотоксический эффект вызван не столько ингибированием пролиферации, сколько гибелью клеток под действием этих белков [19], поскольку через 30 ч уровень включения ³H-тимидина в клетки возрастает, т. е. оставшиеся жизне-

способными после действия белков клетки начинают делиться и повышается их пролиферативная активность.

Действительно, ранее было показано на перевиваемых, высокопролиферирующих клетках меланомы мышей В-16 антипролиферативный, действующий на S-период клеточного цикла эффект ЭПБ, причем часть клеток, по-видимому, находилась в агрегированном состоянии и тем самым сохранила свою жизнеспособность [20].

Таким образом установлен, зависящий от времени инкубации антипролиферативный характер действия ЛПБ и ЭПБ на гомологичную культуру клеток хлопчатника. Различный характер действия ЛПБ и ЭПБ обусловлен, вероятно, структурными особенностями углеводных компонентов этих белков и, как следствие, спецификой взаимодействия или сайтом «узнавания» мембранных рецепторов клеток-мишеней.

Z. S. Khashimova

Antiproliferative activity of cotton glycoproteins

Summary

The antiproliferative activity of extensin-like (ELP) and lectin-like

(LLP) proteins isolated from cotton, on the incorporating of ³H-thymidine into suspension culture of cotton cells was established. The time- and dose-dependent inhibitory effect of ELP and LLP was shown.

З. С. Хашимова

Антипроліферативна активність глікопротеїнів бавовнику

Резюме

Виявлено антипроліферативну активність екстенсину (ЕПБ) і лектинподібних (ЛПБ) білків, виділених з бавовнику, за включенням ³H-тимідину в клітинах суспензійної культури бавовнику. Показано залежну від дози та часу інкубації пригнічуючу дію ЕПБ і ЛПБ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Sharon N., Lis H. Lectins.—London; New York: Chapman and Hill, 1989.—144 p.
2. Lis H., Sharon N. The glycosylation of proteins // Eur. J. Biochem.—1993.—218.—P. 1—27.
3. Лахтин В. М. Биотехнология лектинов // Биотехнология.—1989.—5, № 6.—С. 676—691.
4. Хьюз Р. Гликопротеиды.—М.: Мир, 1985.—140 с.
5. Imboden J. B. The regulation of intracellular signals during lymphocyte activation // Immunol. Today.—1988.—9.—P. 17—18
6. Lamport D. T. A. The protein component of primary cell walls // Adv. Bot. Res.—1965.—2.—P. 151—218.
7. Weiser R. L., Wallner S. J., Waddell J. W. Cell wall and extensin mRNA changes during cold acclimation of pea seedlings // Plant Physiol.—1990.—93.—P. 1021—1026.
8. Ecker J. R., Davis R. W. Plant defense genes are regulated by ethylene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—84.—P. 5202—5206.
9. Holdsworth M. J., Laties G. G. Identification of a wound-induced inhibitor of a nuclear factor that binds the carrot extensin gene // Planta.—1989.—180.—P. 74—81.
10. Esquerre-Tugaye M. T., Mazau D. Effect of a fungal disease on extensin, the plant cell wall glycoprotein // J. Exp. Bot.—1974.—25, N 86.—P. 509—513.
11. Хашимова З. С., Мангутова Ю. С., Сусло М. Э., Бекназарова Д. М., Леонтьев В. Б. Изучение мембранных белков хлопчатника с использованием моноклональных антител // Химия природ. соединений.—1994.—№ 1.—С. 83—87.
12. Здродовский П. Ф., Соколов М. И. Руководство по лабораторной диагностике вирусных и риккетсиозных болезней.—М: Медицина, 1965.—136 с.
13. Мангутова Ю. С., Хашимова З. С., Каталаева Д. М., Сусло М. Э., Леонтьев В. Б. Факторы агглютинации из семян и проростков хлопчатника // Докл. АН Уз. ССР.—1989.—№ 3.—С. 49—52.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.—1951.—193.—P. 265.
15. Хашимова З. С., Саитмуратова О. Х., Мангутова Ю. С., Леонтьев В. Б. Влияние гликопротеидов хлопчатника на биосинтез белков и нуклеиновых кислот // Химия природ. соединений.—1997.—№ 6.—С. 865—870.
16. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄ // Nature.—1970.—227.—P. 680—685.
17. Stuart D. A., Varner J. E. Purification and characterization of a salt-extractable hydroxyproline-rich glycoprotein from aerated carrot discs // Plant Physiol.—1980.—66.—P. 787—792.
18. Хашимова З. С., Мангутова Ю. С., Сусло М. Э., Бекназарова Д. М., Леонтьев В. Б. Действие гликопротеидов хлопчатника на пролиферативную активность клеток // Химия природ. соединений.—1996.—№ 6.—С. 912—915.
19. Рылова С. Н., Козлов А. М., Когтев Л. С., Гаенко Г. П., Дятловицкая Э. В. Антипролиферативная активность нормальной и опухолевой тканей яичников человека // Биохимия.—1997.—62, № 9.—С. 1228—1232.
20. Хашимова З. С., Кузнецова Н. Н., Марданова З. И., Леонтьев В. Б. Изучение механизма действия экстенсинаподобных белков хлопчатника в культуре клеток // Химия природ. соединений.—1999.—№ 3.—С. 372—437.

УДК 612.085.4:577.12.3.853
Надійшло до редакції 05.07.99