



УДК 577.112.853:616—006.487

А. А. Цегельский, Р. Г. Микитюк, М. Д. Луцук

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЦЕПТОРОВ ЛЕКТИНА УЛИТКИ НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ С 1300 N 18

Установлено, что терминальные остатки N-ацетилгалактозамина (рецепторы лектина улитки), в большом количестве экспрессированные на поверхности клеток нейробластомы С 1300 N 18, находятся в составе N-гликозильных цепей комплексного типа гликопротеинов плазматической мембраны и ее микрошипов. С помощью реакции розеткообразования исследована способность клеток нейробластомы С 1300 N 18 формировать контакт с эритроцитами группы А в зависимости от этапов перераспределения рецепторов, индуцируемого лектином улитки.

Введение. В осуществлении межклеточных контактов и взаимодействии клеток с компонентами окружающей среды существенное значение имеют углеводсодержащие макромолекулы клеточной поверхности [1]. В последнее время в ряде исследований отмечается важная роль гликоконъюгатов, содержащих терминальные остатки N-ацетилгалактозамина, в процессах ориентации ряда клеток — зародышевых [2] или метастазирующих опухолей [3]. При исследовании спектра углеводных детерминант поверхности клеток нейробластомы С 1300 N 18 с применением в качестве зондов набора из 11 лектинов [4] нами было выявлено, что на поверхности этих клеток экспрессировано значительное количество углеводных цепей, предположительно в виде антигена А или Форсмана, содержащих терминальные остатки N-ацетил- α -D-галактозамина, которые обуславливают связывание лектина улитки.

В предпринятой работе проведена идентификация гликополимеров в мембране клеток нейробластомы С 1300 N 18, связывающих лектин улитки, а также исследованы функциональные свойства рецепторов, включающие перемещение их в живой клетке после связывания лиганда, и влияние этого процесса на розеткообразование с эритроцитами группы А.

Материалы и методы. В опытах использовали клетки нейробластомы С 1300 N 18, выращенные на матрасах объемом 1,0 л на модифицированной среде Дульбекко с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота. Для цитохимических исследований клетки культивировали на покровных стеклах во флаконах Карреля в течение 48 ч.

Лектин из белой железы улитки (НРА), агглютинин арахиса (РНА), эритроагглютинин фасоли (РНА-Е), лектин чечевицы (LCL) и конъюгаты их с пероксидазой хрена получали по описанному методу [5]. Распластавшие на стекле клетки обрабатывали НРА, как описано ранее [6]. С целью исследования связывания лектина с поверхностью клеток блокировали процессы перераспределения лектин-рецепторных комплексов и их эндоцитоз путем префиксации глутаровым альдегидом [7] или снижением температуры во время реакции до 4 °С. Процессы

© А. А. ЦЕГЕЛЬСКИЙ, Р. Г. МИКИТЮК, М. Д. ЛУЦУК. 1991

перераспределения лектин-рецепторных комплексов наблюдали на живых клетках после 5 мин обработки их НРА (10 мкг/мл при 4 °С) и последующей инкубации при 37 °С в течение 15, 30, 60, 120 и 240 мин в среде без лектина. После фиксации клеток глутаровым альдегидом меченный пероксидазой лектин выявляли с помощью диаминобензидина, препарат заключали в гумми-сироп с глицерином по Лилли [8] и исследовали в световом микроскопе.

В реакции розеткообразования использовали 1 %-ный раствор суспензии эритроцитов группы А в ЗФР (забуференный фосфатом физиологический раствор, рН 7,2) с 5 мг/мл альбумина. Распластанные клетки обрабатывали НРА в концентрации 10 мкг/мл (5 мин при 4 °С) и выдерживали различные сроки (0; 2,5; 5; 7,5; 15 и 30 мин) в среде без лектина при 37 °С. Затем на стекла наносили суспензию эритроцитов и оставляли на 5 мин при 4 °С. После отмывания неадгезированных эритроцитов ЗФР препарат помещали на предметное стекло с каплей ЗФР (клетками вниз) для микроскопического исследования. Регистрировали по 100 клеток на каждую точку опыта. Индекс адгезии (I_a) вычисляли по формуле

$$I_a = \frac{n_1 + n_2 \dots n_8 + n_{10}}{100},$$

где n_1 — сумма эритроцитов на клетках с одним эритроцитом на поверхности; n_2 — соответственно с двумя и т. д., n_{10} — сумма эритроцитов на клетках с более чем 8 эритроцитами на поверхности.

Клеточные мембраны получали после разрушения клеток в гомогенизаторе Поттера — Эльвейса с зазором 0,075 мм в растворе (10 мМ трис-НСI, рН 7,2, 5 мМ MgCl₂, 0,15 М KCl). Ядра отделяли центрифугированием при 200 *g* в течение 3 мин. Грубую мембранную фракцию получали из супернатанта осаждением при 25 000 *g* (50 мин). Дальнейшую очистку клеточных мембран осуществляли с помощью центрифугирования в ступенчатом градиенте концентрации сахарозы. Собирали фракции с плотностью 1,180—1,105 г/см³. Для фракционирования клеточных мембран методом Фолча [9] использовали грубую мембранную фракцию. Гликолипиды выделяли из хлороформной фазы методом, описанным Свеннерхольмом [10], гликопротеины осаждали из водно-метанольной фазы с помощью диализа против этанола и последующего центрифугирования.

Состав гликопротеинов анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии DS-Na модифицированным методом Лемман [11, 12]. В качестве стандарта для определения молекулярных масс (м. м.) использовали препарат белка из клеточной стенки *Yersinia pseudotuberculosis* (предоставлен А. Т. Щербачевым и Л. Н. Сердобинцевым). Гликопротеины выявляли с помощью PAS-реакции в геле [13] и по связыванию лектин-пероксидазных конъюгатов с репликами электрофореграмм на листках нитроцеллюлозы, полученными методом электроблота [14]. Для проявления реплик лектин-пероксидазные конъюгаты использовали в концентрации 50 мкг/мл. Время обработки 2 ч. Перед обработкой PNA проводили десалирование в 0,05 н. H₂SO₄ при 80 °С в течение 50 мин. Связывание ConA выявляли непрямым методом, применяя в качестве второго реагента пероксидазу хрена [15]. В контрольных опытах блокирование связывания лектинов осуществляли с помощью соответствующих углеводов в концентрациях 0,2—0,5 М.

Результаты и обсуждение. При обработке префиксированных клеток лектином улитки наблюдалось равномерное распределение лектин-рецепторных комплексов на их поверхности, что проявляется на свето-оптическом уровне характерной картиной контурирования клеток (рис. 1, а). Равномерное распределение рецепторов к НРА на поверхности клеток нейробластомы С 1300 N 18 выявлено и на электронно-

микроскопическом уровне [5]. Из литературы известно, что равномерное распределение мембранных рецепторов имеет место и у живых клеток, но при обработке лектинами при температуре не выше 4 °С.

Нами обнаружены следующие различия в связывании НРА с поверхностью живых и префиксированных клеток. Концентрация лектина, необходимая для достижения достаточно интенсивной окраски плазматической мембраны у живых клеток, примерно в 5 раз ниже, чем у префиксированных. Значительно сокращается и продолжительность обработки лектином (5 мин против 30 мин). И, что наиболее существен-

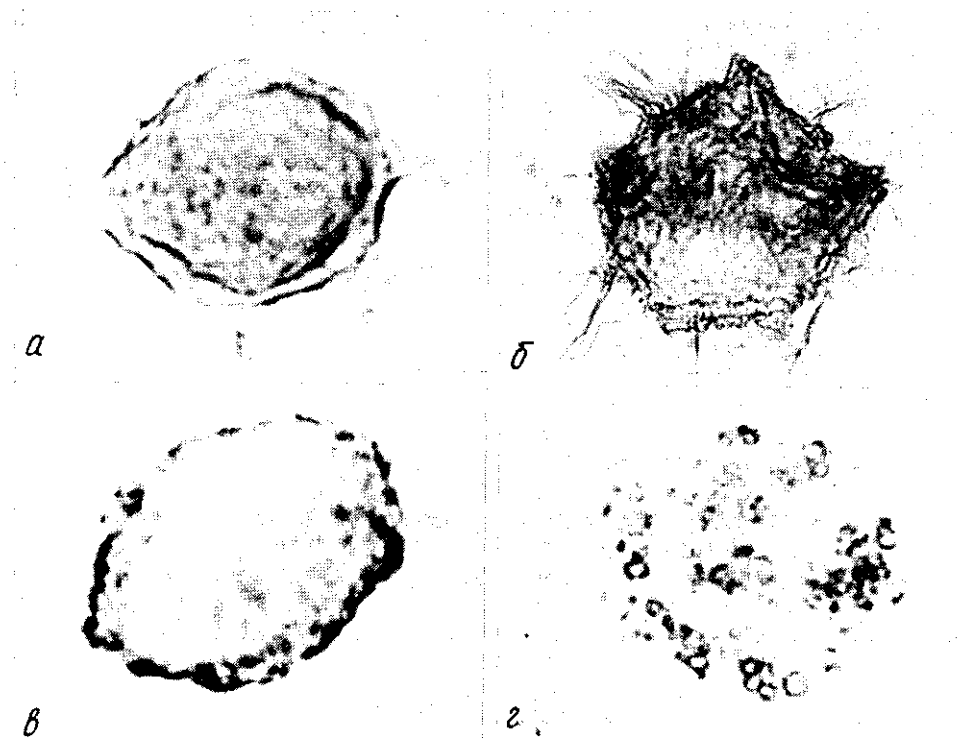


Рис. 1. Связывание НРА-пероксидазных конъюгатов с клетками нейробластомы С 1300 N 18. Связывание с поверхностью префиксированной (а) и живой (б) клеток; динамика перемещения лектин-рецепторных комплексов в клетке спустя 30 (в) и 240 (г) мин после связывания лектина (см. текст). $\times 450$

Fig. 1. Binding of HPA-HRP conjugates with neuroblastoma C 1300 N 18 cells. Binding on the surface of prefixed cell (a); binding on the surface with living cell (б); the dynamics of lectin-receptor complexes redistribution 30 min (в) and 240 min (г) after binding of lectin (see the text). $\times 450$

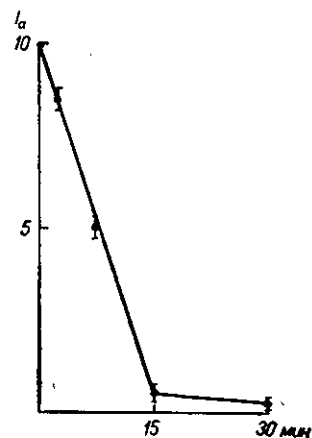
венно, обработка живых клеток меченым лектином позволяет выявить поверхностные клеточные структуры, которые не выявляются после фиксации. Как видно из рис. 1, б, на поверхности нефиксированных клеток лектин-пероксидазный комплекс связывается с поверхностью клетки, а также ее микрошипами — сенсорными образованиями, позволяющими клетке ориентироваться в окружающей среде. Известно, что микрошипы появляются, когда клетка прикрепляется к субстрату, мигрирует или округляется перед делением [16]. Связывание НРА с этими образованиями свидетельствует о наличии в составе гликоконъюгатов их поверхности терминальных остатков N-ацетилгалактозамина. Последующая фиксация клеток глутаровым альдегидом не влияет на картину окраски поверхностных структур, и микрошипы хорошо выявляются, что, вероятно, связано с иммобилизацией этих поверхностных структур клетки за счет мультивалентности используемого лектина.

Динамика перераспределения НРА-рецепторных комплексов в живых клетках нейробластомы характеризуется следующим образом.

Спустя 15 мин после связывания НРА-рецепторные комплексы локализованы в плазматической мембране, однако микрошипы обнаруживаются слабее и в их основании появляются кластеры лектин-рецепторных комплексов. Через 30 мин происходит укрупнение кластеров, микрошипы уже не видны (рис. 1, в). К 60 мин кластеры лектин-рецепторных комплексов выявляются внутри клеток и могут быть обнаружены на многих уровнях фокуса микроскопа, клетки теряют окраску поверхности, что особенно четко наблюдается к 2—4 ч после начала инкубации (рис. 1, г). Эти изменения в локализации свидетельствуют, что НРА-рецепторные комплексы перемещаются в ретроградном от микрошипов направлении с последующей концентрацией в цитоплазме вокруг ядра. Подобное перераспределение рецепторов, индуцированное связыванием лектинов, выявлено при исследовании филоподий конусов роста симпатических нейронов в культуре [17].

Рис. 2. Показатель розеткообразовательной способности (I_a) клеток нейробластомы в зависимости от времени после импульсной метки их НРА

Fig. 2. Index of rosetting ability (I_a) of neuroblastoma cells in relation to the time after the pulse labelling with НРА



Для исследования взаимосвязи между перераспределением поверхностных рецепторов, содержащих терминальный N-ацетилгалактозамин, и способностью клеток нейробластомы к образованию межклеточных контактов использовали реакцию розеткообразования с эритроцитами группы А. Как следует из приведенного графика (рис. 2), максимальная розеткообразовательная способность клеток нейробластомы, обработанных НРА, наблюдается непосредственно после связывания лектина с клеточной поверхностью, т. е. в период, когда лектин-рецепторные комплексы равномерно связаны с плазматической мембраной. В последующем в процессе перераспределения лектин-рецепторных комплексов и их эндоцитоза розеткообразовательная способность резко снижается и к 30-й мин практически не выявляется. Таким образом, к этому времени количества поверхностных рецепторов, необходимых для формирования межклеточного контакта, уже не достаточно. Эти данные согласуются с предположением [18] о том, что кластерирование лектин-рецепторных комплексов на клеточной поверхности не является обязательным условием для формирования контакта между клетками, а микрошипы поверхности клеток нейробластомы являются важным фактором агглютинации [19].

С целью идентификации среди мембранных компонентов рецепторов, связывающих НРА, грубую мембранную фракцию подвергли экстракции по методу Фолча с последующим выделением гликолипидов и гликопротеинов. Исследование ингибиторной активности полученных гликолипидов и гликопротеинов в отношении НРА в тесте гемагглютинации показало, что гликопротеины мембран клеток нейробластомы С 1300 N 18 блокируют гемагглютинирующую активность НРА в минимальных концентрациях 26 мкг/мл и являются значительно более сильным ингибитором, чем гликолипиды, проявляющие активность в концентрации 3300 мкг/мл. Это позволяет сделать вывод о том, что рецепторы, содержащие терминальные остатки N-ацетилгалактозамина и выявляемые на поверхности клеток нейробластомы С 1300 N 18, представлены преимущественно гликопротеинами.

С целью изучения молекулярного состава гликопротеинов плазматических мембран клеток нейробластомы препараты очищенных мем-

бран солюбилизировали и анализировали с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии DS-Na. Электрофоретический спектр полипептидов и гликопротеинов мембран клеток нейробластомы С 1300 N 18, их молекулярные массы представлены на рис. 3.

Окраска гликопротеинов на полосках геля с помощью PAS-реакции позволяет выявить лишь две слабые зоны даже в гелях, перегруженных белком. С помощью лектинов обнаруживается значительно большее число гликопротеинов. Обработкой реплик электрофореграмм

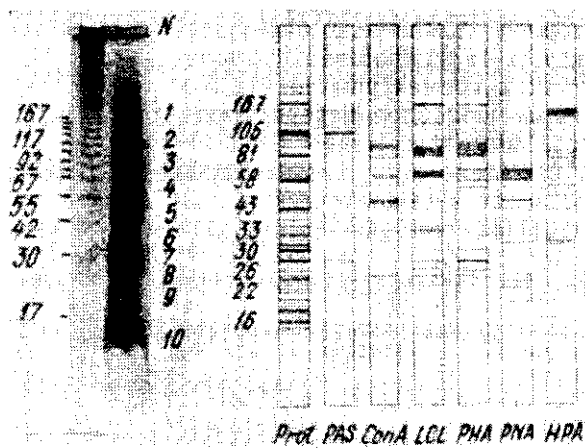


Рис. 3. Полипептидный и гликопротеиновый состав мембран клеток нейробластомы С 1300 N 18: *a*—электрофоретический спектр полипептидов мембран клеток нейробластомы (наиболее выраженные полипептидные полосы пронумерованы и приведена шкала молекулярных масс $\cdot 10^3$); *b*—локализация гликопротеинов на электрофореграммах, выявляемых PAS-реакцией и связыванием лектинов с нитроцеллюлозными репликами фореграмм (см. текст)

Fig. 3. Polypeptide and glycoprotein composition of neuroblastoma C 1300 N 18 cells: *a*—electrophoretic spectra of membrane polypeptides of neuroblastoma cells. The most prominent bands are enumerated and molecular weight scale is designated; *b*—localization of glycoproteins on the electroforegrams as revealed by PAS method and lectin binding with nitrocellulose replicas (see the text)

комплексом НРА с пероксидазой было показано, что рецепторы, связывающие НРА, появляются в гликопротеинах с м.м. 33 000, 150 000 и особенно интенсивно — 90 000. Параллельное связывание ConA, LCL и PNA-E гликопротеинами с м.м. 90 000 указывает на то, что терминальные остатки N-ацетилгалактозамина, обнаруживаемые НРА, находятся в составе гликополимеров, содержащих N-гликозильные цепи комплексного типа.

PNA, обладающий специфичностью к олигосахаридам O-гликозильного типа, интенсивно связывался с гликопротеинами с м.м. 70 000 и в меньшей мере рядом других зон, в том числе и с м.м. 33 000. Это свидетельствует о том, что небольшая часть N-ацетилгалактозаминных терминальных рецепторов находится и в составе O-гликозильных цепей без терминальных остатков сиаловых кислот, что характерно для опухолевых клеток [20]. Ранее нами было показано, что 17% клеток нейробластомы С 1300 N 18 связывают PNA на поверхности без предварительного десалирования [7].

Результаты исследования позволяют сделать вывод о том, что рецепторы лектина улитки, содержащие терминальные остатки N-ацетилгалактозамина, в большом количестве экспрессируются на поверхности клеток нейробластомы С 1300 N 18 и представлены преимущественно гликопротеинами и только в небольшой мере — гликолипидами. Углеводные цепи этих гликопротеинов в большинстве представлены N-гликанами комплексного типа с незавершенностью процессов гликозилирования. Гликопротеины с терминальными остатками N-ацетилгалактозамина входят в состав сенсорных поверхностных образований клеток

нейробластомы микрошипов, играющих важную роль в процессах межклеточного узнавания и взаимодействия. Полученные результаты также свидетельствуют в пользу того, что реакция розеткообразования с использованием в качестве мембранного маркера группоспецифических эритроцитов адекватно отображает процесс перераспределения лектин-рецепторных комплексов и их интернализацию из плоскости мембраны внутрь клетки. В то же время с помощью лектина улитки можно моделировать степень эритроцитарного розеткообразования на поверхности клеток нейробластомы.

Резюме

Встановлено, що термінальні залишки N-ацетилгалактозаміну (рецептори лектину слимака), у великій кількості експресовані на поверхні клітин нейробластоми C 1300 N 18, знаходяться у складі N-глікозильних ланцюгів комплексного типу глікопротеїнів плазматичної мембрани та її мікрошипів. За допомогою реакції розеткоутворення досліджена здатність клітин нейробластоми C 1300 N 18 формувати контакт з еритроцитами групи А в залежності від етапів перерозподілу рецепторів, стимульованого лектином слимака.

Summary

The expression and chemical composition of receptors to garden snail lectin (terminal residues of N-acetyl-galactosamine) on the surface of neuroblastoma C 1300 N 18 cells have been investigated using cytochemical and electrophoretic technique. Receptors are mainly represented by membrane glycoproteins (m. w. 33, 90 and 150 KDa), containing carbohydrate chains of N-type, and to a lesser extent by glycolipids. Receptors were localized on the cell surface as well as in microvilli. The lectin-receptor complexes were subjected to aggregation and endocytosis during 60 minutes, which resulted in rapid decrease of rosetting ability with A group red blood cells.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Хьюз Р. Гликопротеины.— М.: Мир, 1985.— 140 с.
2. Presence of unique glycoconjugate on the surface of rat primordial germ cells during migration / A. R. Fazel, B. A. Schulte, R. P. Thompson, S. S. Spicer // Cell Different.— 1987.— 21, N 3.— P. 199—211.
3. Rademacher T. W., Parekh R. B., Dwek R. A. Glycobiology // Ann. Rev. Biochem.— 1988.— 57.— P. 785—838.
4. Lutsik M. D., Ghula N. M., Tsegelsky A. A. Glycoproteins of neuroblastoma C 1300 in relation to the intensity of cell proliferation // Interlec II: Abstr.— Tartu, 1989.— P. 46.
5. Хомутовский О. А., Луцки М. Д., Передерей О. Ф. Электронная гистохимия рецепторов клеточных мембран.— Киев: Наук. думка, 1986.— 167 с.
6. Miller M., Karnowsky M., Diamandopoulos G. An improved immunoperoxidase technique for identifying SV-40 and T antigens by light microscopy // Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.— 1974.— 146, N 2.— P. 432—437.
7. Щегельский А. А., Луцки М. Д., Лашкай А. Ф. Исследование углеводных компонентов поверхности клеток нейробластомы C 1300 с помощью методов цитохимии и агглютинации лектинами // Эксперим. онкология.— 1989.— 11, № 5.— С. 30—34.
8. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия.— М.: Мир, 1969.— 645 с.
9. Hamaguchi H., Cleve H. Solubilisation of human erythrocyte membrane glycoproteins and separation of the MN glycoproteins from a glycoproteins with I, S and A activity // Biochim. et biophys. acta.— 1972.— 278, N 2.— P. 271—280.
10. Свеннерхольм Л. Ганглиозиды: выделение // Методы исследования углеводов / Под ред. А. Я. Хорлина.— М.: Мир, 1975.— С. 347—357.
11. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 // Nature.— 1970.— 227, N 5259.— P. 680—685.
12. Portio M., Pearson A. Improved resolution of the myofibrillar proteins with SDS-PAGE // Biochim. et biophys. acta.— 1977.— 490, N 1.— P. 27—34.
13. Keyser J. Staining of serum glycoproteins after electrophoretic separation in polyacrylamide gels // Anal. Biochem.— 1964.— 9, N 2.— P. 249—252.
14. Луцки М. Д., Кусень С. И. Исследование мембранных гликопротеинов эритроцитов человека с применением лектинов // Укр. биохим. журн.— 1987.— 59, № 6.— С. 3—9.

15. *Barat N., Avrameas S.* Surface and intracellular localization of concanavalin A in human lymphocytes // *Exp. Cell. Res.*—1973.—**76**, N 2.— P. 451—455.
16. *Молекулярная биология клетки* / Б. А. Албертс, Д. Брей, Дж. Льюис и др.—М.: Мир, 1987.— Т. 3.— 296 с.
17. *Carbonetto S., Argon Y.* Lectin induce the redistribution and internalization of receptors on the surface of cultured neurons // *Develop. Biol.*—1980.—**80**, N 2.— P. 364—378.
18. *Roth J.* The lectins. Molecular probes in cell biology and membrane research.— Jena : VEB Gustav Fisher Verlag, 1978.— 186 p.
19. *Nicolson G. L.* The interaction of lectins with animal cell surface // *Int. Rev. Cytol.*—1974.—**39**.— P. 89—190.
20. *Takahashi H. K., Metoki R., Nakomori S.* Immunoglobulin G 3 monoclonal antibody directed to Tn antigen (tumor associated α -N-acetylgalactosaminyl epitope) that does not cross-react with blood group A antigen // *Cancer Res.*—1988.—**48**, N 15.— P. 4361—4367.

Львов, отд-ние Ин-та биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Получено 22.05.90
Киев