



УДК 577.3.05

А. В. Тимошенко, С. Н. Черенкевич

АГГЛЮТИНАЦИЯ ТИМОЦИТОВ КРЫС, ВЫЗВАННАЯ АГРЕГИРОВАННЫМ КОНКАНАВАЛИНОМ А

С использованием метода светопропускания исследовали влияние преципитирующих в присутствии конканавалина А (КонА) НАДН, пероксидазы и каталазы на КонА-индуцированную агглютинацию тимоцитов крыс. Установлено, что агрегированный КонА вызывает значительное ускорение реакции агглютинации в сравнении с нативным КонА. Скорость агглютинации тимоцитов зависит от размеров агрегатов молекул КонА. Полученные результаты свидетельствуют о ключевой роли кластеризации мембранных рецепторов в обеспечении КонА-индуцированной агглютинации клеток.

Введение. Агглютинация лимфоцитов, индуцированная митогенным лектином КонА, обусловлена взаимодействием молекул митогена с мембранными гликопротеинами, которое приводит к слипанию клеток. Молекула нативного КонА, состоящая из четырех идентичных субъединиц, способных связывать углеводы [1], выступает при этом в качестве «сшивающего» агента, формирующего межклеточные контакты [2]. Прочность контактов между клетками зависит от числа молекул КонА, участвующих в их образовании. Под действием КонА, а также ряда других лектинов и антител на поверхности лимфоцитов образуются мембранные кластеры, представляющие собой взаимодействующие лиганд-рецепторные комплексы [2—6]. По-видимому, кластеризация мембранных рецепторов обеспечивает формирование прочных, образованных несколькими молекулами лектина, межклеточных контактов. В пользу такой точки зрения свидетельствуют данные литературы о торможении реакции агглютинации клеток в присутствии веществ, инактивирующих кэппинг мембранных рецепторов [7—10]. Но если верно предположение о ключевой роли кластеризации мембранных рецепторов в КонА-индуцированной агглютинации лимфоцитов, то в присутствии агрегированных молекул КонА следует ожидать ускорения агглютинации клеток вследствие образования мембранных кластеров на клеточной поверхности. В настоящей работе приведены данные о стимулирующем действии агрегатов молекул КонА на агглютинацию тимоцитов крыс.

Материалы и методы. В работе использовали лимфоидные клетки, выделенные из тимуса белых беспородных крыс, полученных из питомника лабораторных животных АМН СССР «Рапполово» (Ленинград. обл.). Тимус декапитированных животных измельчали и промывали раствором охлажденного фосфатно-солевого буфера, рН 7,3, содержащего (в мМ): 137 NaCl, 2,7 KCl, 5 Na₂HPO₄, 1,5 KH₂PO₄, и СаCl₂. После фильтрации через марлевый фильтр клеточную суспензию центрифугировали в течение 5 мин при скорости 1 500 об/мин (лабораторная центрифуга ОПН-3) и суспендировали осадок в исходном буфере. Число жизнеспособных клеток по тесту с трипановым синим составляло не менее 95 %. Рабочая концентрация клеток была 5·10⁶ кл/мл.

Агглютинацию клеток, инициированную КонА и его агрегатами, исследовали с помощью метода лазерной нефелометрии, описанного ранее [11], по изменению величины светопропускания клеточных суспензий при длине волны 632,8 нм. Измерения проводили при температуре 37 °С и постоянном перемешивании образцов.

Реакцию преципитации КонА с использованными в работе соединениями (каталаза, пероксидаза, НАДН) регистрировали по изменению величины светопропускания соответствующих растворов.

В работе использовали КонА и каталазу фирмы «Sigma» (США), пероксидазу и НАДН фирмы «Reanal» (ВНР).

Результаты и обсуждение. Преципитация НАДН, пероксидазы и каталазы в присутствии КонА. Лектины способны образовывать агрегированные комплексы с целым рядом углеводов содержащих соединений вследствие их преципитации [1]. Нами установлено, что этот процесс инициируется в растворе КонА при добавлении таких веществ, как НАДН, пероксидаза и каталаза. Данные рис. 1

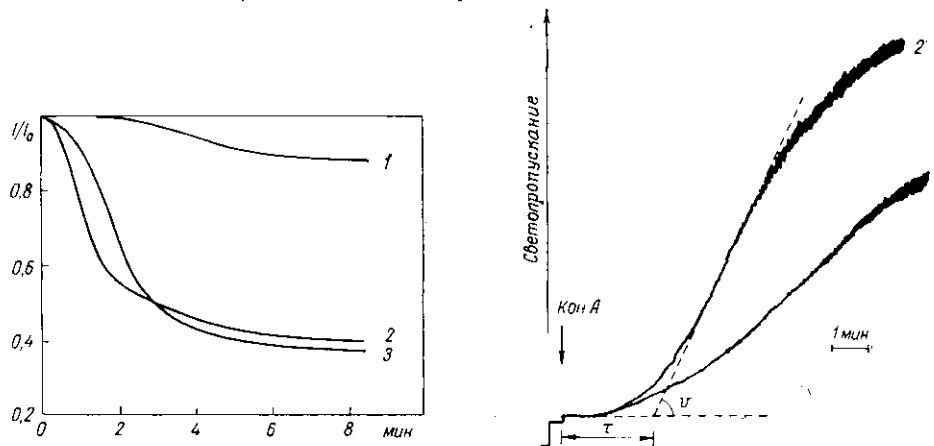


Рис. 1. Изменение величины светопропускания раствора КонА (0,5 мг/мл) от времени после добавления: 1 — каталазы (1 мг/мл); 2 — пероксидазы (0,1 мг/мл); 3 — НАДН (5 мМ)

Fig. 1. Changes in the light transmission of the Con A solution (0.5 mg/ml) as a function of time with different additives: 1 — catalase (1 mg/ml), 2 — peroxidase (0.1 mg/ml), 3 — NADH (5 mM)

Рис. 2. Изменение величины светопропускания суспензии тимоцитов крыс, индуцированное КонА в отсутствие (1) и присутствии (2) 0,2 мМ НАДН

Fig. 2. Con A-induced change in the light transmission of the thymocyte suspensions in the absence (1) and in the presence (2) of NADH (0.2 mM)

демонстрируют, что величина светопропускания растворов быстро уменьшается в присутствии НАДН и пероксидазы. Эффект каталазы менее выражен. Важно отметить, что в присутствии углеводного гаптена α -метил-*D*-маннозида, блокирующего места связывания углеводов в молекуле КонА, реакции преципитации не наблюдается. α -Метил-*D*-маннозид также легко разрушает агрегированные комплексы КонА — НАДН и КонА — пероксидаза (данные не приведены).

Агглютинация тимоцитов в присутствии веществ, преципитируемых КонА. После добавления КонА (25 мкг/мл) к суспензии тимоцитов крыс происходит образование клеточных агглютинатов, вследствие чего суммарная светорассеивающая поверхность клеток уменьшается, а величина светопропускания суспензии соответственно возрастает. Непрерывно регистрируемые кинетические кривые изменения светопропускания суспензий тимоцитов в процессе их агглютинации приведены на рис. 2. Для характеристики процесса агглютинации тимоцитов были использованы следующие эмпирические параметры: максимальная скорость агглютинации v и время задержки реакции τ (см. рис. 2). Оказалось, что вещества, преципитирующие в присутствии КонА, являются эффективными стимуляторами КонА-индуцированной агглютинации тимоцитов крыс. При добавлении НАДН к суспензии тимоцитов наблюдается значительное увеличение скорости КонА-индуцированной агглютинации клеток. При

этом изменение величины светопропускания суспензии выходит на плато в течение 10 мин, в то время как в контроле этот процесс занимает около 1 ч.

Аналогичные изменения наблюдаются под действием каталазы и пероксидазы. Стимулирующий эффект НАДН, пероксидазы и каталазы на КонА-индуцированную агглютинацию тимоцитов существенным образом зависит от их концентрации (рис. 3). С повышением концентрации этих веществ скорость агглютинации клеток возрастает в несколько раз. Отметим, что наблюдается соответствие в способности каталазы, пероксидазы и НАДН преципитировать в присутствии КонА

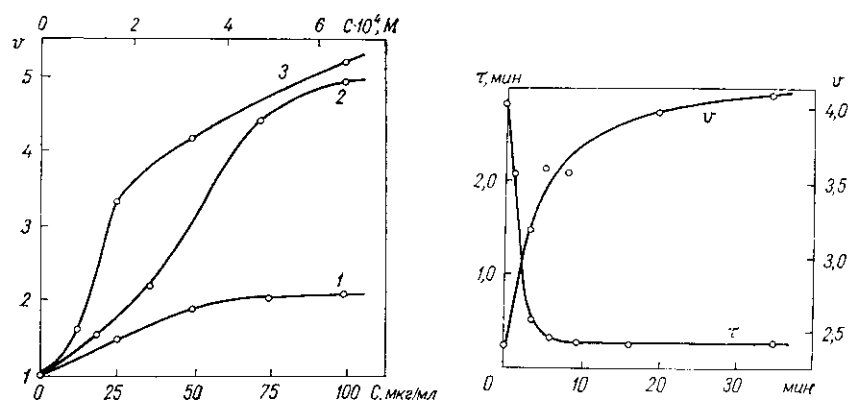


Рис. 3. Зависимость скорости КонА-индуцированной агглютинации тимоцитов крыс от концентрации каталазы (1), пероксидазы (2) и НАДН (3). Обозначения по оси абсцисс для 1 и 2 — внизу, для 3 —верху

Fig. 3. Effect of catalase (1), peroxidase (2) and NADH (3) on the rate of the Con A-induced thymocyte agglutination. Designations along abscissas: below—curves 1, 2; above—curve 3

Рис. 4. Зависимость максимальной скорости (v) и времени задержки (τ) процесса агглютинации тимоцитов крыс, инициированного агрегированным КонА (25 мкг/мл), от времени совместного инкубирования КонА и НАДН. Конечная концентрация НАДН—0,3 мМ

Fig. 4. Aggregated Con A-induced changes in the maximal rate (v) and the time lag (τ) agglutination of the rat thymocytes as a function of incubation time of Con A (25 $\mu\text{g/ml}$) with NADH (0.3 mM)

(рис. 1) и ускорять реакцию агглютинации клеток (рис. 3). Можно предположить, что скорость агглютинации клеток зависит от размеров агрегатов молекул лектина.

Зависимость скорости агглютинации тимоцитов от размеров агрегатов комплексов КонА — НАДН. Для выяснения влияния КонА различной степени агрегированности на агглютинацию клеток реакцию инициировали добавлением аликвот преципитатов КонА — НАДН, полученных при различных временах совместного инкубирования КонА и НАДН. В этой серии экспериментов КонА (0,5 мг/мл) и НАДН (6 мМ) инкубировали при комнатной температуре и добавляли по 100 мкл к 2 мл суспензии тимоцитов. Оказалось, что с увеличением времени совместного инкубирования КонА и НАДН происходит резкое ускорение процесса агглютинации клеток (рис. 4). Следовательно, агрегаты КонА — НАДН обладают более высокой агглютинирующей активностью, чем эквимоллярное количество нативного КонА. Поскольку в процессе реакции преципитации размеры образующихся агрегатов увеличиваются, то полученные данные дают основание заключить, что основным фактором, определяющим скорость агглютинации клеток в рассматриваемом случае, является величина агрегатов КонА — НАДН. Отметим, что ускорение агглютинации тимоцитов не является следствием простого укрупнения образующихся ассоциатов из-за сорбции на поверхности клеток агрегированного лек-

тина, так как вносимое количество агреганта (100 мкл) не может существенно повлиять на изменение величины светорассеяния исследуемой системы.

С увеличением времени совместного инкубирования КонА и ИАДН наблюдается также снижение времени задержки реакции τ (рис. 4). Кривая агглютинации клеток при этом трансформируется от *S*-образной (при действии нативного КонА) к гиперболической (при действии агрегированного КонА) форме. Это означает, что в присутствии агрегатов молекул КонА реагглютинация клеток становится незначительной. Отметим также хорошую корреляцию между величиной τ (рис. 4) и размером агрегированных комплексов КонА — ИАДН (рис. 1).

В настоящей работе установлено, что КонА-индуцированная агглютинация тимоцитов крыс существенно ускоряется в присутствии веществ, преципитируемых КонА.

Взаимодействие ИАДН, пероксидазы или каталазы с КонА приводит к образованию агрегатов молекул лектина в составе соответствующих комплексов. Эффекты действия агрегированного и неагрегированного КонА в эквимольных количествах на агглютинацию клеток существенно различаются. Агрегаты молекул КонА обеспечивают более высокую скорость агглютинации тимоцитов в сравнении с нативным КонА. Этот эффект имеет принципиальное значение для понимания механизма КонА-индуцированной агглютинации клеток.

Показано [10, 12, 13], что скорость агглютинации клеток под действием КонА зависит от текучести мембранных липидов, состояния клеточного цитоскелета, активности некоторых мембранных ферментов. Перечисленные факторы объединяет их общее свойство влиять на процессы перераспределения мембранных рецепторов. Агглютинация лимфоцитов тормозится в присутствии ингибиторов кэппинга мембранных рецепторов: азида натрия, динитрофенола, цитохалазина В, сульфгидрильных реагентов [7—10]. Ранее нами [7] было установлено, что агглютинация тимоцитов крыс при температурах ниже 25 °С также сильно заторможена. Отметим в этой связи, что при снижении температуры связывание КонА с мембранными рецепторами клеток существенно не меняется, однако процессы кластеризации лиганд-рецепторных комплексов практически полностью прекращаются. С другой стороны, повышенная способность к агглютинации опухолевых клеток в сравнении с нормальными является, по-видимому, следствием относительно более свободного движения их рецепторов, образующих мембранные кластеры, в плоскости мембраны [4]. Во всех рассмотренных случаях регуляция процесса агглютинации клеток протекает с участием мембранных кластеров, образующихся при функционировании активированных нативным КонА внутриклеточных и мембранных систем.

Количество конканавалиновых рецепторов на поверхности лимфоидных клеток составляет величину порядка 10^7 , а константа диссоциации соответствующих лиганд-рецепторных комплексов — $6 \cdot 10^{-8}$ М [14]. При использованной в настоящей работе концентрации КонА (25 мкг/мл) обеспечивается оккупация большей части конканавалиновых рецепторов на поверхности клеток, что создает благоприятные условия для их кластеризации. По-видимому, при сорбции лектиновых агрегатов на клетках конканавалиновые рецепторы вследствие латеральной диффузии в мембране [4] связываются со стерически доступными молекулами КонА в агрегате с образованием мембранного кластера. Следовательно, полученные в настоящей работе данные о чувствительности реакции агглютинации клеток к размеру агрегатов молекул КонА являются прямым подтверждением предположения о ведущей роли процессов кластеризации мембранных рецепторов в обеспечении агглютинации клеток. Отметим, что агглютинация тимоцитов под действием агрегированного КонА приобретает необратимый характер, поскольку наряду с существенным увеличением скорости v сильно снижается величина времени задержки τ реакции (рис. 4). Другими словами, образующиеся клеточные агглютинаты отличаются высокой устойчивостью.

Агглютинация клеток, индуцированная агрегатами молекул КонА, является удобной моделью для исследования начальных стадий активации лимфоцитов и роли процессов кластеризации мембранных рецепторов. Заметим, что КонА инициирует преципитацию таких биологически важных веществ, как иммуноглобулины, гликопротеины, полисахариды [1]. Поэтому не исключено, что устойчивость мембранных кластеров лимфоцитов зависит наряду с другими причинами от присутствия в примембранных слоях высвобождаемых клеткой углеводсодержащих веществ. Полученные нами результаты показывают важность развития такого подхода для анализа процессов взаимодействия лектинов с лимфоцитами, кластеризации мембранных рецепторов и межклеточных взаимодействий.

AGGLUTINATION OF RAT THYMOCYTES INDUCED BY AGGREGATED CONCAVALIN A

A. V. Timoshenko, S. N. Cherenkevich

V. I. Lenin Byelorussian State University, Minsk

Summary

The effect of NADH, peroxidase and catalase precipitated in the presence of concanavalin A (Con A) on the Con A-induced agglutination of rat thymocytes has been analyzed by the light transmission method. The aggregated Con A causes a considerable acceleration of agglutination compared with the action of native Con A. The rate of thymocyte agglutination depends on Con A-aggregated size. These results testify to the key role of the membrane clusters formation in the provision of Con A-induced cell agglutination.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Франц Х. Лектины: свойства, функции и возможности применения // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.— 1980.— № 1.— С. 3—10.
2. Метакровский Е. В. О механизме межклеточных контактов и изменении мембран клеток при дифференцировке // Молекуляр. биология.— 1981.— 15, № 4.— С. 753—767.
3. Молекулярная биология клетки / Б. Албертс, Д. Брей, Дж. Льюис и др.— М.: Мир, 1986.— Т. 2.— 312 с.
4. Зенбуш П. Молекулярная и клеточная биология.— М.: Мир, 1982.— Т. 3.— 320 с.
5. Role of cell surface receptor mobility in concanavalin A-induced agglutination of Novikoff hepatoma and normal rat liver cells / P. Mastromarino, G. Neri, A. Serga, E. F. Walborg // J. Cell Sci.— 1980.— 42, N 1.— P. 169—182.
6. Roth J. The lectins: molecular probes in cell biology and membrane research // Exp. Pathol.— 1978.— Suppl. 3.— P. 1—186.
7. Тимошенко А. В., Черенкевич С. Н. Регуляция конканавалином А состояния редокс-систем плазматической мембраны тимоцитов // Цитология.— 1987.— 29, № 9.— С. 1107.
8. Concanavalin A-mediated thymocyte agglutination: a model for a quantitative study of cell adhesion / C. Capo, F. Garrouste, A. N. Benoliel et al. // J. Cell Sci.— 1982.— 56, N 1.— P. 21—48.
9. Loo F. Lectin-induced lymphocyte agglutination. An active cellular process? // Exp. Cell. Res.— 1973.— 82, N 2.— P. 415—425.
10. Pfeifer R. W., Patterson B. M. Modulation of lectin-stimulated lymphocytes agglutination and mitogenesis by estrogen metabolites: Effect on early events of lymphocyte activation // Arch. Toxicol.— 1986.— 38, N 3.— P. 157—164.
11. Тимошенко А. В., Черенкевич С. Н., Самаль А. Б. Роль активных форм кислорода в конканавалин А-индуцированной агглютинации лимфоцитов // Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 2.— 1986.— № 3.— С. 47—50.
12. Rule G. S., Kruuw J., Lepock J. R. Membrane lipid fluidity as rate limiting in the concanavalin A-mediated agglutination of pyВНК cells // Biochim. et biophys. acta.— 1979.— 556, N 3.— P. 399—407.
13. Singer J. A., Morrison M. Effect of adenosine on concanavalin A agglutination of human erythrocytes // Ibid.— 1980.— 598, N 1.— P. 40—50.
14. Ng M. H., Ng W. S. Concanavalin A receptor capping and blastogenesis in human lymphocytes: inhibition by egg lecithin // Cytobios.— 1981.— 32, N 1.— P. 39—46.

Белорус. гос. ун-т им. В. И. Ленина, Минск

Получено 27.01.89.