



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 4 * № 12 * 1978

УДК 577.21

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ КОНТАКТОВ ЛИМФОЦИТОВ IN VITRO

*Демин В. В., Москвин-Тарханов М. И., Мартынов В. И.,
Мирошников А. И.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Исследование модифицирующего действия мембраноактивных пептидов мелиттина и грамицидина S показало, что эти соединения, не нарушая нативной структуры лимфоцитов, вызывают образование межклеточных контактов. Аналогичный эффект может быть получен в отсутствие мембраноактивных соединений путем инкубации лимфоцитов при пониженной температуре. Образование контактов обусловлено, по-видимому, агрегацией рецепторов клеточной поверхности, вызванной иммобилизацией мембранных липидов за счет их взаимодействия с модификаторами или при снижении температуры ниже точки фазового перехода. Наличие такой агрегации показано при исследовании распределения ферритин-меченнего конканавалина на поверхности лимфоцитов и внутримембранных белков эритроцитов, выявляемых методом замораживания-скалывания.

Как известно, образование контактов между предшественниками иммунокомпетентных клеток — необходимое звено генерации иммунного ответа (см., например, [1]). Межклеточные контакты являются также важнейшей составной частью процесса деструкции клеток-мишеней (например, опухолевых) при их взаимодействии с соответствующей субпопуляцией лимфоцитов [2]. Очевидно, что характер межклеточных взаимодействий определяется структурой и свойствами цитоплазматических мембран, и в первую очередь их внешних поверхностей. Поэтому исследование процессов контактного взаимодействия и их связи со структурой клеточной поверхности представляет значительный интерес для понимания механизмов иммунных реакций и поиска способов направленного воздействия на них.

Проведенное нами исследование модифицирующего действия некоторых мембраноактивных соединений белковой и пептидной природы показало, что соединения ряда мелиттина и грамицидина вызывают агрегацию мембранных белков, выявляемых методом замораживания-скалывания. Хотя этот метод дает информацию о топографии белков в гидрофобной зоне мембран, можно было предположить, что сходные изменения топографии компонентов мембран происходят и на поверхности клетки. В этом случае действие этих мембраноактивных соединений может приводить к изменениям таких свойств клеточной поверхности (например, топографии рецепторов мембран), которые определяют характер межклеточных взаимодействий. Действительно, оказалось, что действие мелиттина и грамицидина вызывает значительное возрастание степени агрегированности лекチンсвязывающих компонентов поверхности лимфоцитов и именно в этих условиях наблюдается увеличение взаимной адгезии клеток.

При исследовании ультратонких срезов суспензии интактных лимфоцитов, инкубированных при 37°, наблюдается ~9% контактирующих клеток (таблица). Длина контактирующих участков мембран обычно менее 1 мкм, а ширина межмембранных пространства достигает нескольких сотен ангстрем. Лишь в некоторых случаях на относительно небольшом протяжении она уменьшается до 200—400 Å (рис. 1A). Такая ультраструктура контактирующих участков клеток не позволяет отнести их к какому-либо известному типу контактных соединений [3]. Инкубация лимфоцитов при 37° в среде, содержащей 100 мкг/мл мелиттина или грамицидина S, не вызывает каких-либо заметных изменений нативной структуры клеток. Однако действие этих мембраноактивных соединений приводит к значительному увеличению числа контактирующих клеток (см. таблицу). Заметно возрастает длина контактирующих участков мембран, особенно в случае грамицидина S, а ширина межмембранных пространства уменьшается до 150—200 Å (рис. 1B, Г). Как в межмембранных, так и в подмембранных пространствах области контактов не наблюдается каких-либо специализированных структур. Поэтому такие индуцированные контакты могут быть отнесены к так называемым простым соединениям (*simple junction*) — наиболее распространенной форме неспециализированных межклеточных контактов [3].

Широко известные в настоящее время способы изменения адгезивных свойств клеток сводятся либо к ферментативной модификации клеточной поверхности (например, обработка пейраминидазой и галактозидазой [4]), или к «спиванию» клеток с помощью би- или мультивалентных агентов типа растительных агглютининов или антител, взаимодействующих с соответствующими рецепторами на поверхности соседних клеток [5]. Использованные в данной работе соединения не обладают какой-либо ферментативной активностью. В то же время было показано, что мелиттин и грамицидин S, влияющие на многие мембранные процессы, не имеют в чувствительных к ним клетках соответствующих белковых рецепторов и их мембранный активность обусловлена взаимодействием с липидной фазой мембран [6, 7]. Благодаря особенностям своей структуры неполярные участки молекул грамицидина и мелиттина внедряются в гидрофобную зону мембран [8, 9] и, как было показано с помощью парамагнитных зондов, иммобилизуют углеводородные цепи липидных молекул [6, 10]. Известно, что иммобилизация мембранных липидов может быть достигнута не только введением в состав мембран соответствующих соединений, но и простым снижением температуры среды ниже точки фазового перехода мембран (см., например, [11]). Как видно из таблицы, 15-минутная инкубация интактных лимфоцитов при 4° подобно инкубации с мембраноактивными пептидами вызывает заметное увеличение числа контактирующих клеток. Существенно, что тонкая структура контактирующих участков клеток аналогична той, которая наблюдается при действии мембраноактивных пептидов (рис. 1B). Это дает основание полагать, что причины образования контактов в обоих случаях аналогичны. При действии пониженной температуры количество контактирующих лимфоцитов наиболее велико. Это, по-видимому, обусловлено тем, что в отличие от мелиттина и грамицидина S, иммобилизующих в зависимости от дозы лишь часть липидов [12], температурный фазовый переход вызывает иммобилизацию всего мембранныго липида.

Каким же образом иммобилизация липидов мембран может влиять на их адгезивные свойства? Известно, что снижение температуры ниже точки

Образование межклеточных контактов
В-лимфоцитов

Воздействие	Количество контактирующих клеток, %
Контроль	9
Инкубация:	
с мелиттином	28
с грамицидином S	28
Охлаждение	44

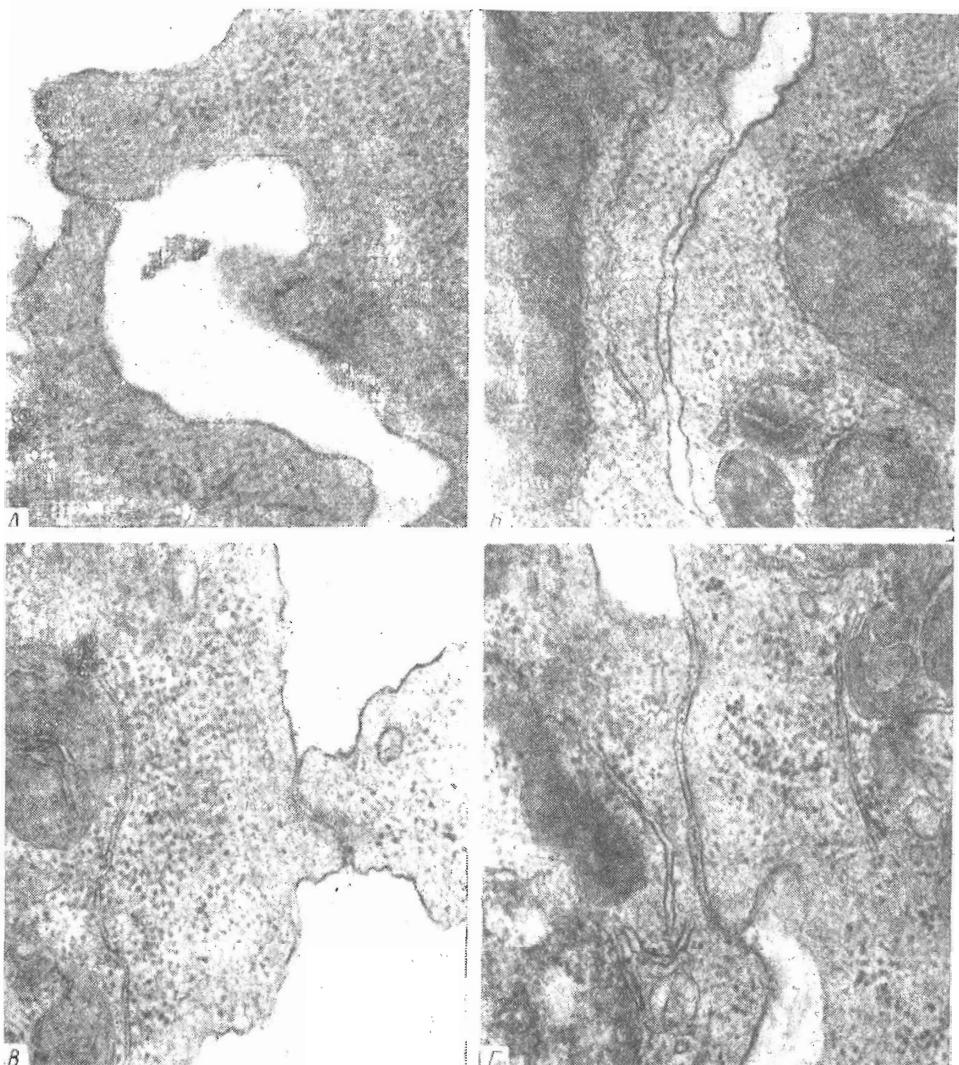


Рис. 1. Структура области индуцированных межклеточных контактов в суспензии лимфоцитов: *A* — контроль (интактные лимфоциты, инкубированные при 37°); *B* — охлаждение (инкубация при 4°); *C* — инкубация с мелиттином; *Г* — инкубация с грамицидином S ($\times 50\,000$)

фазового перехода приводит к так называемому разделению фаз, т. е. к раздельной агрегации мембранных белков и липидов [13]. В ряде случаев этот эффект доступен прямому наблюдению с помощью электронно-микроскопических методов и выражается в кластеризации внутримембранных белков, выявляемых методом замораживания-скалывания (см., например, [14]). Уникальная особенность метода замораживания-скалывания состоит в том, что раскол проходит вдоль толщи мембрани между двумя образующими ее мономолекулярными слоями и таким образом обнажает внутренние гидрофобные поверхности [15]. На этих поверхностях выявляется гладкий фон, образованный липидным компонентом, на котором расположены многочисленные глобулярные частицы (рис. 2). Согласно современным представлениям, эти внутримембранные частицы являются белковыми комплексами [16].

Возможность индуцирования мембраноактивными пептидами перегруппировки мембранных белков была исследована на примере мембран эри-

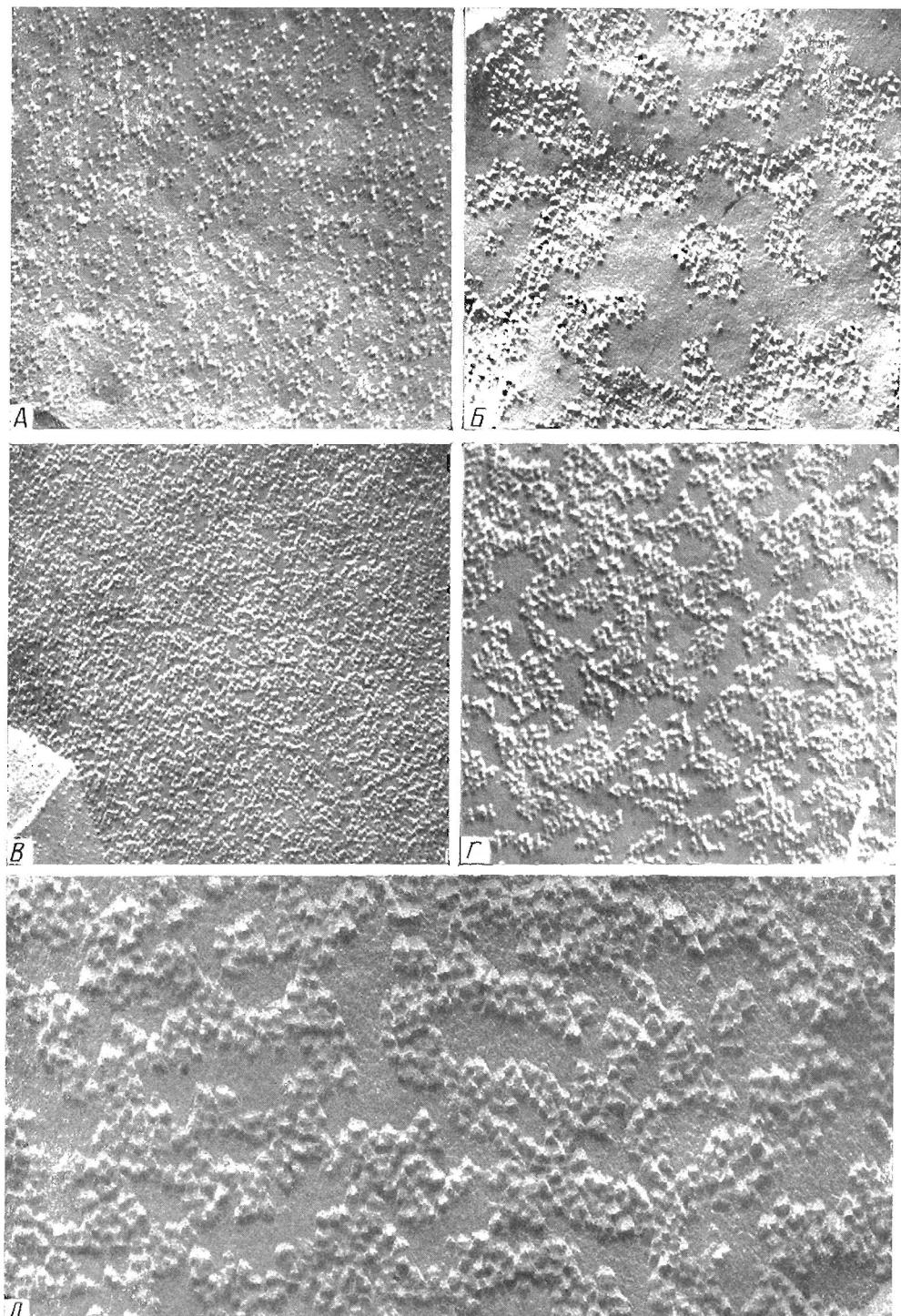


Рис. 2. Структура замороженных сколов мембран эритроцитов. *А* и *В* — соответственно вогнутая и выпуклая поверхности сколов интактных мембран. *Б* и *Г* — соответственно вогнутая и выпуклая поверхности сколов мембран эритроцитов, обработанных мелитином ($\times 50\ 000$). *Д* — выпуклая поверхность скола мембранны после обработки грамицидином *S* ($\times 150\ 000$). Направление оттенения — снизу вверх

Биоорганическая химия, № 12, к статье Демина В. В. и др.

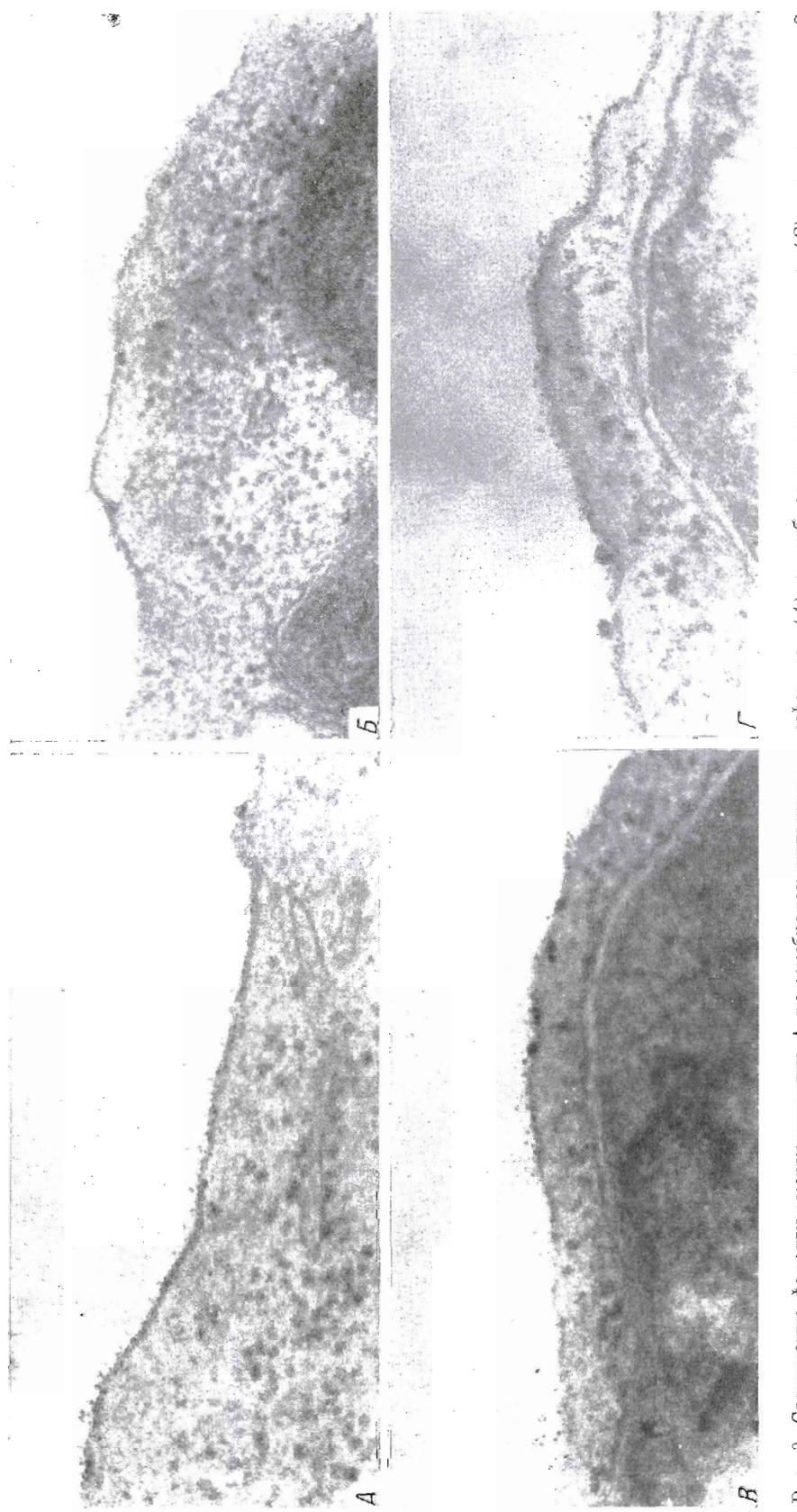


Рис. 3. Связывание ферритин-конjugированной А на мембранных интактных лимфоцитов (A), инкубированных с мелкими (B) и грамицидином S (C), а также охлажденных до 4° (D) ($\times 100,000$).

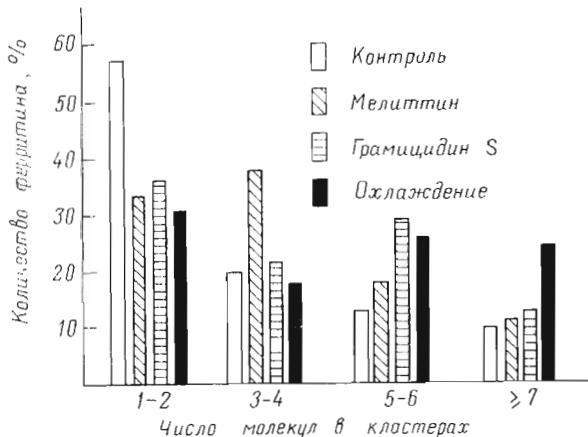


Рис. 4. Распределение ферритин-конканавалина А на поверхности лимфоцитов. 1—2 — «свободный» ферритин; 3—4, 5—6, 7 — кластеры, состоящие из 3 и 4, 5 и 6, а также 7 и более молекул. На оси ординат отложено относительное содержание ферритина в кластерах данного типа

троцитов человека. Как видно из микрофотографий (рис. 2A, B), в интактных эритроцитах внутримембранные частицы распределены беспорядочно и равномерно по поверхности скола. Обработка эритроцитов мелиттином или грамицидином приводит к перегруппировке внутримембранных частиц: заметно возрастает их агрегированность и увеличивается площадь гладких участков скола (ср. рис. 2A, B с рис. 2Б, Г и Д). Хотя метод замораживания-скалывания дает информацию о топографии белков в гидрофобной области мембран, не исключено, что сходные изменения топографии компонентов мембран происходят и на их поверхности. Другими словами, иммобилизация липидов может приводить к агрегации ненелипидных компонентов на клеточной поверхности и тем самым влиять на адгезивные свойства клеток. Для выяснения этого вопроса олигосахарида гликопротеинов мембран лимфоцитов маркировались ферритином-меченым конканавалином А [17]. Специфичность связывания ферритина-конканавалина А поверхностью лимфоцитов проверялась путем предварительной инкубации клеток с немеченым конканавалином А. Количество ферритина, выявляемого на мембранах, подвергнутых такой обработке, не превышало 30 молекул на 1 мкм², что составляло только 5% от всего маркированного ферритином лектина, способного связаться клеткой. Связывание ферритин-конканавалина А без предварительной обработки немеченым лектином достигало 600 молекул на 1 мкм² как в контрольных, так и в опытных образцах (см. рис. 3). Вместе с тем его распределение на поверхности лимфоцитов изменялось при действии мембраноактивных соединений или низкой температуры (рис. 4). Так, в случае интактных лимфоцитов, инкубированных при 37°, «свободного» ферритина было около 60%. Инкубация лимфоцитов с мембраноактивными пептидами примерно вдвое уменьшает количество «свободного» ферритина и соответственно увеличивает его содержание в кластерах. Существенно, что к аналогичному результату приводит инкубация интактных лимфоцитов при пониженной температуре (см. рис. 4). Такое сходство дает основание полагать, что причиной агрегации рецепторов действительно является иммобилизация липидов мембран. Очевидно, что индуцируемая таким способом агрегация несет неспецифический характер. Однако она может приводить к возрастанию локальной плотности рецепторов, ответственных за межклеточные контакты, что, по-видимому, и является причиной их образования.

Экспериментальная часть

В-лимфоциты выделяли из миндалин человека по методу [18]. Суспензия в 199-й среде на растворе Хенкса содержала около 10^8 клеток/мл. Содержание других клеточных форм не превышало 10—15% общего числа клеток.

Конканавалин А (Serva, ФРГ) маркировали ферритином (Serva, ФРГ) с помощью глутарового альдегида (Koch Light, Англия) [19]. Мелиттин выделяли из яда пчелы *Apis mellifica*, полученного из Научно-исследовательского института химии Горьковского государственного университета по методу [20]. Синтетический грамицидин S был получен в лаборатории химии белка (ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР).

Индукрование образования межклеточных контактов. Лимфоциты (10^8 клеток/мл) инкубировали в 199-й среде на растворе Хенкса, содержащей 100 мкг/мл мелиттина или грамицидина S, в течение 15 мин при 37° . В качестве контрольных использовали лимфоциты, инкубированные в тех же условиях в присутствии эквивалентного количества растворителя (этанол для грамицидина и вода для мелиттина). При исследовании действия пониженной температуры суспензию лимфоцитов инкубировали 15 мин при 4° . После окончания инкубации часть клеток (около половины) немедленно фиксировали для электронно-микроскопического исследования, другую часть использовали для изучения связывания ферритин-меченного конканавалина А.

Маркирование гликопротеинов ферритином А. Известно, что конканавалин А в определенных условиях способен сам модифицировать топографию своих рецепторов [17]. Для предотвращения этого эффекта мембранные лимфоциты стабилизировались путем инкубации с 0,3% глутаровым альдегидом в течение 10 мин [19]. Затем клетки дважды промывали 199-й средой на растворе Хенкса и инкубировали 15 мин в этой же среде, содержащей 80 мкг/мл (по белку) ферритин-меченного конканавалина А. После 4-кратной промывки 0,1 М фосфатным буфером клетки фиксировали для электронно-микроскопического исследования. Специфичность связывания проверяли путем предварительной инкубации суспензии лимфоцитов с 300 мкг/мл конканавалина А.

Электронно-микроскопическое исследование. Суспензию лимфоцитов фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом 1 ч при 4° . После однократной промывки фосфатным буфером клетки дофиксировали 1,5% OsO₄ при комнатной температуре 4 ч. После трех промывок 50% этанолом и обезвоживания проводкой по спиртам клетки на 24 ч помещали в насыщенный раствор уранилацетата в абс.этаноле. Дважды промытые абс.этанолом образцы окончательно обезвоживались в абс.ацетоне (3 смены по 10 мин) и заливали в ЭПОН-812. Серии из 15—20 срезов толщиной ~ 500 Å получали на ультратоме I.K.B. Приготовление реплик с замороженных сколов мембран эритроцитов проводили после 30-минутной инкубации консервированной эритроцитарной массы в среде, содержащей 30% глицерина, по методу [21]. При исследовании действия пептидов на структуру сколов концентрированную эритроцитарную массу инкубировали 30 мин при 37° в среде, содержащей 200 мкг/мл исследуемого вещества. Реплики и ультратонкие срезы исследовали в электронном микроскопе JEM 100C при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Подсчет числа контактирующих клеток осуществляли при низких увеличениях ($5—10 \times 1000$) на одиночных срезах. Для оценки количества связывающегося ферритин-конканавалина А использовали срезы толщиной ~ 500 Å и подсчитывали число визуализуемых молекул ферритина, приходящихся на 1 мкм периметра мембранны. При определении степени сгруппированности ферритина на клеточной поверхности молекулы считали кластеризованными, если расстояние между ними не превышало 400 Å. Одиночные, а также попарно расположенные молекулы считали некласте-

ризованными. Кроме того, выделяли три вида кластеров, содержащих соответственно по 3—4, 5—6 и 7 и более молекул ферритина. И в контролльном, и в опытном образцах исследовали по 20 клеток с длиной обсчитываемого участка мембранны каждой не менее 2 мкм.

Авторы выражают искреннюю благодарность Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание и плодотворное обсуждение работы, а также В. А. Несмеянову и Р. Л. Комалевой за предоставление лимфоцитов и ферритин-конканавалина А.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брондз Б. Д. (1977) Успехи совр. биол., 88, 207—218.
2. MacLennan I. C. (1972) Transplant. Revs., 13, 67—72.
3. Архипенко В. М., Гебрильский Л. А., Черненко Ю. П., Чуич Г. А. (1975) в сб.: Структура и функция биологических мембран, с. 77—95, «Наука».
4. Killian M. C., Beyer C. F., Bowers W. E. (1977) Exptl Cell. Res., 109, 211—221.
5. Sharon N., Lis H. (1973) Science, 177, 945—955.
6. Henger D., Schummer U., Schnepel G. H. (1973) Biochim. et biophys. acta, 291, 15—22.
7. Mollay C., Kreil G. (1973) Biochim. et biophys. acta, 316, 196—203.
8. Мирошников А. И., Семенов С. Н., Снежкова Л. Н., Сотников А. И., Иванов В. Т. (1975) Тезисы доклада на Всесоюзном симпозиуме «Физиологическая роль поверхностно-активных веществ», 1976 г. Черновцы, с. 69—70.
9. Семенов С. Н., Мельник Е. И., Снежкова Л. Г., Мирошников А. И., Иванов В. Т. (1977) Биоорган. химия, 3, 1055—1063.
10. Островский Н. Д., Булгакова В. Г., Жукова И. Г., Карапетьянц А. С., Розанцев И. Г., Симакова И. М. (1976) Биохимия, 41, 175—181.
11. Hubbell W. L., McConnell H. M. (1971) J. Amer. Chem. Soc., 93, 314—326.
12. Mollay C. (1976) FEBS Lett., 64, 65—68.
13. McConnell H. M., Devaux P., Scandella C. (1972) in: Membrane Research (Fox C. F. ed.), pp. 27—37, Acad. Press.
14. Grant C. W., McConnell H. M. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 4653—4657.
15. da Silva P., Branton D. (1970) J. Cell. Biol., 45, 598—605.
16. Muhlethaller K. M., Moor H., Szarkowsky J. (1965) Planta, 67, 305—315.
17. Yahara I., Edelman G. M. (1973) Exptl Cell Res., 81, 143—155.
18. Davidson W. F., Parish C. R. (1975) J. Immunol. Methods, 7, 291—300.
19. Yahara I., Edelman G. M. (1975) Exptl Cell Res., 91, 125—142.
20. Gaulde J., Hanson J. M., Rumjanek F. D., Shiponi R. A., Vernon Ch. A. (1976) Eur. J. Biochem., 61, 369—376.
21. Зайкин И. Э., Фихте Б. А. (1973) Цитология, 15, 230—235.

Поступила в редакцию
4.VII.1978

A STUDY ON THE IN VITRO FORMATION OF LYMPHOCYTE CONTACTS

DEMIDEN V. V., MOSKVIN-TARHANOV M. I., MARTYNOV V. I.,
MIROSHNIKOV A. I.

M. V. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The modifying action of the membrane active peptides — melittin and gramicidin S — on the cell membranes has been studied. These compounds were shown not to disrupt the native structure of the lymphocytes but to cause the formation of intercell contacts. A similar effect was observed without peptides by lowering the incubation temperature. It is suggested that in both cases the cell-cell contact formation results from the aggregation of the cell surface receptors, which in turn is brought about by immobilization of membrane lipids owing to their interaction with the modifiers, or as the result of the temperature decrease below the phase transition temperature. This aggregation was demonstrated by the studies of the ferritin-bound lectin distribution on the surfaces of lymphocytes and erythrocyte intramembrane proteins as revealed by freeze-fracture method.