

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ДЕЙСТВИЮ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ ЗАВИСИТ ОТ ЦЕЛОСТНОСТИ ЛИПИДНЫХ РАФТОВ В МЕМБРАНЕ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ

© Н. А. Филатова, В. И. Чубинский-Надеждин,
В. А. Иванов, Е. А. Морачевская¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ *электронный адрес: elenno@mail.cytspb.rssi.ru*

Работа посвящена анализу роли богатых холестерином липидных микродоменов (рафтов) в реализации клеточных механизмов естественного иммунитета и противоопухолевой защиты. Исследовали литическое действие естественных киллерных клеток (ЕКК) в зависимости от содержания холестерина и состояния липидных рафтов в плазматической мембране трансформированных клеток. В данной работе мишенями являлись клетки эритролейкемии человека K562. Для частичной экстракции холестерина использовали метил-бета-циклодекстрин (МБЦД) — циклический олигосахарид, избирательно связывающий стеролы. Снижение уровня холестерина после инкубации клеток с МБЦД подтверждали энзиматическим методом. С помощью ³H-уридинового теста оценивали активность ЕКК (спленоцитов мыши) в отношении культивируемых клеток K562 в различных условиях, в том числе после их инкубации с МБЦД или альфа-циклодекстрином (аЦД) — структурным аналогом МБЦД, не связывающим стеролы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что снижение содержания холестерина в клетках K562 (после обработки МБЦД в концентрации 2.5 или 5 мМ) приводит к полной утрате их чувствительности к литическому действию ЕКК. Скорее всего, это обусловлено нарушением структуры липидных рафтов, целостность которых критически зависит от уровня мембранного холестерина. Сделанные заключения согласуются с данными по визуализации изменений клеточной поверхности, полученными при флуоресцентном мечении ганглиозида GM1 — маркера богатых холестерином липидных микродоменов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: плазматическая мембрана, естественные киллеры, холестерин, липидные рафты, клетки K562, метил-бета-циклодекстрин, альфа-циклодекстрин.

Как известно, активность лимфоцитов, называемых естественными киллерами, в отношении трансформированных клеток представляет собой первую линию противоопухолевой защиты на уровне организма. Литическая активность ЕКК относится к важнейшим показателям иммунного статуса организма и определяется особенностями взаимодействия киллерных клеток (эффекторов) с трансформированными клетками-мишенями. Молекулярные механизмы этого взаимодействия являются в настоящее время предметом интенсивных исследований. Следует отметить, что цитотоксичность ЕКК не ограничена главным комплексом гистосовместимости (non-MHC-restricted cytotoxicity) и не зависит от антител и комплемента, поэтому клетки-киллеры могут лизировать без предварительной сенсibilизации сингенные, аллогенные и ксеногенные клетки-мишени.

В настоящее время более детально изучены мембранные структуры лимфоцитов-эффекторов, предложены функциональные схемы, ведущую роль в которых выполняют активирующие и ингибирующие рецепторы плазматической мембраны ЕКК (Lanier, 2005). Значительно менее понятны молекулярная природа и организация поверхностных лигандов трансформированных клеток-мишеней, также определяющих их распознавание и лизис, и в конечном счете эффективность работы системы естест-

венного иммунитета. Среди предполагаемых мишеней на поверхности опухолевых клеток следует выделить две группы мембранных молекул: во-первых, ганглиозиды — гликозилированные сфинголипиды, включающие в себя один остаток сиаловой кислоты или более, во-вторых, гликозил-фосфатидилинозитол-заякоренные белки (GPI-anchored proteins). Повышенное содержание некоторых ганглиозидов (GM1, GM2 и GM3) характерно для многих трансформированных клеток, в том числе для клеток эритролейкемии человека K562 (Ando et al., 1987; Dougall et al., 1987). Результаты иммунологических исследований указывают на то, что в гемопозитических клетках экспрессируется молекулярный маркер CD48 (Brown et al., 1998; Latchman et al., 1998). Этот лиганд клеточной поверхности, относящийся к типичным GPI-связанным белкам, специфически распознается активирующим рецептором 2B4 (CD244) естественных киллерных клеток (Watzl, Long, 2003). Сообщается также, что именно GPI-заякоренная (GPI-anchored) форма CD59 в мембране клеток-мишеней (K562 и U937) способствует повышению их чувствительности к действию ЕКК (Omidvar et al., 2006). Предполагается, что для взаимодействия рецепторов киллерных клеток с маркером CD59 существенна его ассоциация с липидными рафтами (lipid rafts) в мембране клеток-мишеней.

Известно, что в нативных клетках ганглиозиды и GPI-связанные белки являются обязательными компонентами липидных рафтов — мембранных микродоменов, характеризующихся повышенным содержанием холестерина, сфинголипидов и насыщенных жирнокислотных остатков (Harder, Simons, 1999; Brown, London, 2000; Pike, 2003, 2009). Согласно современным представлениям, рафты имеют важное значение для функций клетки и процессов передачи сигнала. Многочисленные исследования последнего десятилетия демонстрируют, что целостность липидных рафтов необходима для работы большинства мембранных рецепторов (см. обзоры: Brown, 2006; Pike, 2009). Более того, именно динамика рафтов и ее изменения представляют собой одно из ключевых звеньев в реализации сигнальных каскадов с участием цитоскелета (Chichili, Rodgers, 2009). Ряд данных свидетельствует о том, что ассоциация с рафтами может быть решающим фактором, определяющим активность интегральных мембранных белков. Неоднократно показано участие липидных рафтов в формировании и структуре рецепторных комплексов в Т- и В-лимфоцитах (Katagiri et al., 2001; Pigeon, 2002), а также в естественных киллерных клетках (Lou et al., 2000; Riteau et al., 2003; Watzl, Long, 2003; Kondadasula et al., 2008). В то же время значительно меньше внимания уделяется второму участнику иммунных взаимоотношений, а именно клеткам-мишеням. Поэтому мы обратились к изучению роли мембранного холестерина и рафтов в трансформированных клетках, являющихся потенциальными мишенями лимфоцитов, в том числе естественных киллеров.

Задача настоящей работы заключалась в исследовании чувствительности клеток лейкемии человека K562 к литическому действию ЕКК при частичной экстракции мембранного холестерина, т. е. при нарушении целостности липидных рафтов в клетках-мишенях.

Материал и методика

Клетки миелоидной лейкемии человека K562, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН), культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки и 80 мкг/мл гентамицина. Клетки K562 использовали в качестве клеток-мишеней в цитотоксическом тесте.

Клетками-эфektорами служили спленоциты интактных мышей линии СЗНА (из питомника «Рапполово» РАМН, Санкт-Петербург). Суспензию спленоцитов освобождали от эритроцитов с помощью гипотонического шока (Филатова и др., 2008б). Как показано ранее, среди спленоцитов ЕКК составляют около 5—15 % (Mattes et al., 1979; Bowlin et al., 1990), их наличие и функциональная активность подтверждены в исследованиях цитотоксичности.

³H-уридиновый цитотоксический тест (Hashimoto, Sudo, 1971) в нашей модификации (Филатова и др., 2008б) использовали для определения естественной киллерной активности спленоцитов мышей. Клетки K562 (мишени) метили ³H-уридином (уд. акт. 999Бк/моль). На 2—3 млн клеток добавляли $2 \cdot 10^5$ Бк изотопа и инкубировали при 37 °С в течение 2 ч. Далее клетки двукратно отмывали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин, после чего ресуспендировали в бессывороточной среде,

подсчитывали в камере Горяева и разводили до нужной концентрации в среде RPMI-1640 без сыворотки, содержащей 20 mM HEPES, pH 7.3, 80 мкг/мл гентамицина и 5 мкг/мл РНКазы. Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней в пробах составляло 20 : 1. Пробы инкубировали в пластиковых 96-луночных круглодонных планшетах в течение 18 ч при 37 °С в атмосфере с 5 % CO₂, после чего содержимое лунок переносили на бумажные фильтры, промывали последовательно физиологическим раствором, 5%-ной ТХУ и 96%-ным этанолом. Радиоактивность измеряли в сцинтилляционном счетчике LS6500 (Beckman). Уровень литической активности ЕКК оценивали с помощью цитотоксического индекса (ЦИ), отражающего долю погибших клеток в процентах:

$ЦИ \% = (1 - N_i / N_o) \cdot 100$, где N_i и N_o — число импульсов в присутствии (N_i) и в отсутствие (N_o) клеток-эфektоров (спленоцитов).

Для частичной экстракции холестерина использовали акцептор стеролов метил-бета-циклодекстрин (МбЦД) (Christian et al., 1997; Zidovetzki, Levitan, 2007). Клетки K562 инкубировали в присутствии МбЦД в концентрации 0.5—5 mM в течение 15—60 мин при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в среде RPMI-1640 без сыворотки. Параллельно в тех же экспериментах клетки обрабатывали альфа-циклодекстрином (аЦД) — неактивным аналогом, не связывающим стеролы. Контрольными являлись клетки, инкубированные в тех же условиях без добавления реагентов. После отмывки реагента двукратным центрифугированием в течение 5 мин при 200 g клетки оставляли в бессывороточной среде и использовали в цитотоксическом тесте, а также для выделения мембран. Выживаемость клеток после различных обработок оценивали по окраске трипановым синим.

Концентрацию холестерина в мембранах клеток K562 в контроле и после его частичной экстракции (5 mM МбЦД, 30 мин) определяли колориметрическим энзиматическим методом с использованием набора реагентов Cholesterol «E-D» (Vital Diagnostics, Санкт-Петербург). Принцип метода состоит в том, что имеющийся в пробе холестерин окисляется под действием холестеролоксидазы с образованием эквивалентного количества перекиси водорода. Эфиры холестерина, возможно присутствующие в пробе, гидролизуются холестеролэстеразой до свободного холестерина. Уровень перекиси определяли по образованию окрашенных продуктов на основе реакции Триндера, образцы анализировали фотометрически при длине волны 500 нм. Мембранную фракцию получали по методу Хеффнера (Haeffner et al., 1980), концентрацию белка определяли по методу Лоури.

Для флуоресцентного мечения ганглиозида GM1 использовали конъюгат бета-субъединицы холерного токсина с красителем FITC (FITC-CTX, Sigma-Aldrich, США). Для окраски клетки высевали на покровные стекла, предварительно покрытые L-полилизинном (1 мг/мл). После отмывки среды фосфатно-солевым буфером (PBS) клетки фиксировали 3.7%-ным раствором параформальдегида, промывали PBS и инкубировали в присутствии красителя FITC-CTX (2.5 мкг/мл) в течение 10 мин при 4 °С. Рабочий раствор красителя готовили из маточного (0.1 мг/мл) путем разведения в PBS непосредственно перед началом эксперимента. Для получения изображений использовали флуоресцентный микроскоп Carl Zeiss IM35, возбуждая и регистрируя флуоресценцию при длинах волн 488 и 520 нм соответственно.

Результаты

Таблица 1

Содержание мембранного холестерина в клетках K562 до (контроль) и после инкубации с метил-бета-циклодекстрином (МБЦД, 5 мМ, 30 мин)

Вариант опыта	Содержание холестерина	
	мг на 1 мг белка	моль/клетка
Контроль	0.74	$3.5 \cdot 10^{-14}$
Обработка МБЦД	0.24	$1.2 \cdot 10^{-14}$

Основной экспериментальный подход, используемый в данной работе, — это сопоставление функций клеток в норме и при частичной экстракции мембранного холестерина, т. е. в условиях деструкции липидных рафтов. Наиболее адекватным методом модификации стерольного состава мембран является кратковременная инкубация клеток в присутствии бета-циклодекстринов. Существенной методической особенностью таких экспериментов являются обработка и дальнейшее культивирование клеток в среде без сыворотки, поскольку она содержит значительное количество липопротеидов. На первом этапе работы мы исследовали влияние метил-бета-циклодекстрина (МБЦД) на уровень холестерина и распределение маркера липидных рафтов в плазматической мембране клеток K562.

В табл. 1 представлены результаты определения уровня холестерина в препаратах мембран фракций клеток K562 до и после обработки МБЦД (5 мМ, 30 мин). По нашим данным, содержание холестерина в контроле составляло около 0.35 пикомолей на клетку, что соответствует имеющимся в литературе оценкам для клеток K562 (Mannechez et al., 2005). Показано, что инкубация клеток в течение 30 мин с 5 мМ МБЦД приводила к снижению уровня холестерина на 67—70 %, что также согласуется с данными литературы для клеток различных типов (Zidovetzki, Levitan, 2007).

Для оценки состояния клеточной поверхности и липидных рафтов в мембране клеток K562 проведены эксперименты с использованием нетоксичной бета-субъединицы холерного токсина, конъюгированной с флуоресцентным красителем (FITC-СТВ; рис. 1). Известно, что бета-субъединица холерного токсина (СТВ) избирательно связывается с ганглиозидом GM1 (Kuziemko et al., 1996). Этот гликофинголипид, углеводная часть которого включает в себя один остаток сиаловой кислоты, считается маркером липидных рафтов. Согласно используемому протоколу, фиксированные (без пермеабилзации) клетки инкубировали с FITC-СТВ при 4 °С, что исключало интернализацию образующегося на мембране комплекса бета-субъединицы с GM1. На рис. 1 показаны изображения клеток, меченных FITC-СТВ, в контрольных условиях и после обработки МБЦД. Экстракция холестерина приводила к перераспределению метки и снижению суммарной

интенсивности флуоресценции, что, по всей вероятности, отражает нарушение целостности рафтов в мембране клеток K562. Изменения характера и интенсивности флуоресценции наблюдали только после действия МБЦД, но не после инкубации с аЦД — циклическим олигосахаридом, не влияющим на уровень холестерина. Существенное снижение связывания красителя с мембраной модифицированных МБЦД клеток может объясняться нарушением кластеризации GM1. Как показано ранее, для связывания холерного токсина с эукариотической клеткой (мишенью) необходимо взаимодействие бета-субъединицы одновременно с пятью молекулами GM1 в плазматической мембране (Lencer, Tsai, 2003).

В процессе подбора условий для определения цитотоксического действия ЕКК было оценено, как влияет обработка МБЦД на жизнеспособность клеток K562 при варьировании сроков инкубации и концентрации реагента. Показано, что после инкубации в течение 30 или 60 мин в среде RPMI без сыворотки в присутствии 2.5 или 5 мМ МБЦД уровень спонтанной гибели клеток не отличался существенно от контроля. Эти условия обработки использовали в основных экспериментах по определению литической активности ЕКК.

В предшествующих работах действие эффекторов на клетки-мишени всегда оценивали в стандартных условиях — в присутствии 10 % эмбриональной сыворотки в среде культивирования (Филатова и др., 2006, 2008б). Поэтому возник вопрос: как повлияет перевод культуры в среду без сыворотки на киллерную активность спленоцитов мышей? В специальной серии опытов было показано, что значения ЦИ для контрольных клеток K562 в отсутствие и в присутствии сыворотки не различались и были

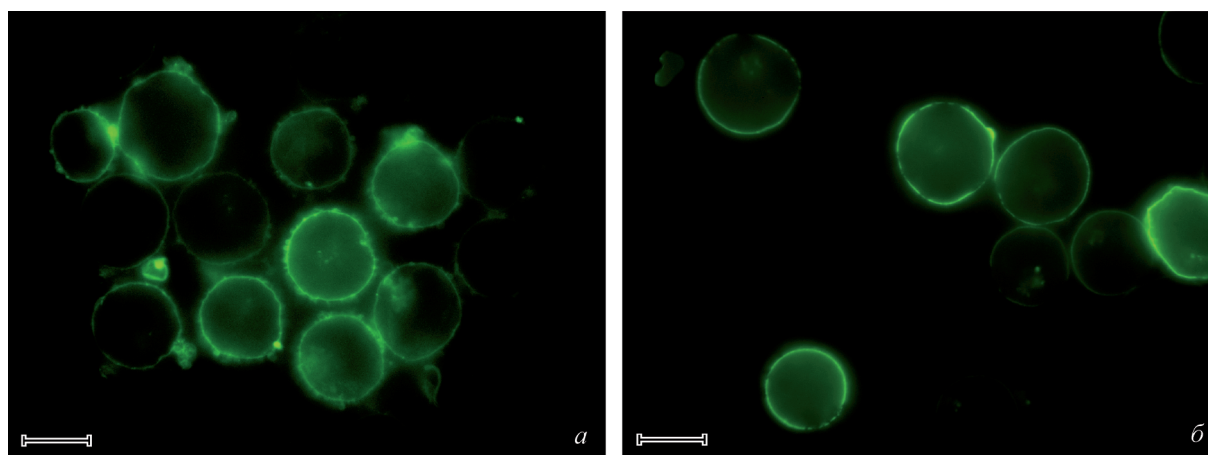


Рис. 1. Флуоресцентное окрашивание ганглиозида GM1 (маркера липидных рафтов в клеточной мембране) с помощью FITC-СТВ. Клетки K562 до (контроль, а) и после (б) инкубации с метил-бета-циклодекстрином (5 мМ, 60 мин). Масштабные отрезки — 10 мкм.

Т а б л и ц а 2

Активность естественных киллеров
в отношении клеток K562 до (контроль)
и после инкубации с МБЦД (5 мМ, 30 мин)
в отсутствие и в присутствии сыворотки

Вариант опыта	ЦИ%	
	без сыворотки	10 % сыворотки
Контроль	24.7 ± 3.9	22.8 ± 3.3
Обработка МБЦД	2.9 ± 0.7	18.0 ± 4.3

Примечание. ЦИ% — цитотоксический индекс; $n = 12$ в каждом варианте эксперимента.

близки к данным, полученным ранее для той же системы эффектор—мишень (табл. 2).

Обнаружено, что после обработки клеток-мишеней холестеринсвязывающим реагентом (МБЦД) в среде без сыворотки чувствительность клеток-мишеней резко уменьшалась, тогда как в присутствии сыворотки эффект был незначителен (табл. 2). Можно полагать, что эффект МБЦД связан со снижением уровня холестерина; присутствие сыворотки, как и ожидалось, нивелирует действие реагента. Приведенные данные (см. табл. 1, 2), а также оценка выживаемости клеток послужили обоснованием для следующих серий опытов по исследованию чувствительности клеток K562 к действию ЕКК.

На рис. 2 обобщены результаты цитотоксических тестов после различных вариантов обработки клеток K562 МБЦД или аЦД. Контролем служили клетки, инкубированные в среде без сыворотки (без добавления реагентов). После инкубации с 0.5 мМ МБЦД чувствительность клеток к действию ЕКК не изменялась. Обработка клеток МБЦД в концентрации 2.5 или 5 мМ приводила к значи-

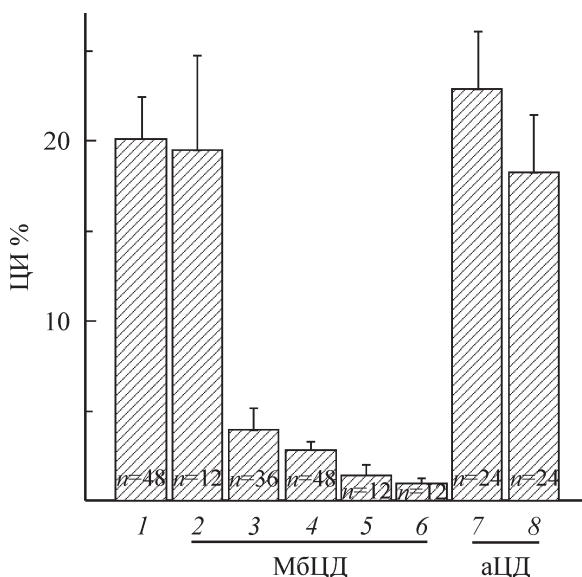


Рис. 2. Изменения чувствительности клеток K562, обработанных метил-бета-циклодекстрином (МБЦД) или альфа-циклодекстрином (аЦД), к литическому действию естественных киллеров.

1 — контроль; 2—4 — 30-минутная инкубация с МБЦД в концентрациях 0.5 (2), 2.5 (3) и 5.0 (4) мМ; 5, 6 — 60 мин МБЦД в концентрациях 2.5 (5) и 5.0 (6) мМ; 7, 8 — 30 мин аЦД в концентрациях 2.5 (7) и 5.0 (8) мМ.

тельному (на 85—95 %) снижению ЦИ. Эффекты были близки для времени инкубации 30 или 60 мин, причем в диапазоне концентраций 2.5—5 мМ мы не отмечали дозозависимости влияния реагента. Можно заключить, что после частичной экстракции холестерина клетки K562 утрачивали чувствительность к литическому действию ЕКК. Этот вывод подтверждают сравнительные данные по тестированию влияния аЦД на активность естественных киллеров (эффекторов) в отношении трансформированных клеток-мишеней (рис. 2). Как видно, обработка клеток K562 аЦД в концентрации 2.5 или 5 мМ не оказывала существенного влияния на активность ЕКК. Значения ЦИ после инкубации с аЦД составляли около 20 %, что близко к контрольному уровню. Таким образом, полная потеря чувствительности к действию ЕКК происходит после инкубации клеток K562 (мишеней) в среде без сыворотки с МБЦД, холестеролсвязывающим агентом, но не с аЦД, структурным аналогом МБЦД, не связывающим стеролы.

Обсуждение

Итак, нами обнаружено, что литическое действие естественных киллеров критически зависит от содержания холестерина в клетках эритролейкемии K562, которые служили в качестве клеток-мишеней в цитотоксическом тесте. Сопоставление эффектов циклодекстринов доказывает, что утрата чувствительности трансформированных клеток-мишеней обусловлена именно снижением уровня (частичной экстракцией) мембранного холестерина.

До недавнего времени холестерин в составе клеточных мембран рассматривался только как фактор, определяющий вязкоэластичные свойства липидного бислоя. В рамках этих традиционных представлений интерпретировать полученные в настоящей работе данные было бы довольно сложно. Можно было бы постулировать возможные изменения подвижности мембранных белков в зависимости от уровня стеролов. Однако показано, что в отличие от модельных систем доминирующую роль в динамике клеточных мембран и подвижности интегральных белков играют взаимосвязи со структурами кортикального цитоскелета (Kwik et al., 2003; Chichili, Rodgers, 2009). Имеющиеся данные указывают на то, что экстракция холестерина приводит к повышению, а не к понижению (как это ожидалось для липидного бислоя) жесткости плазматической мембраны клеток эндотелия (Byfield et al., 2004) и эритролейкемии человека K562 (Morachevskaya et al., 2007). Предполагается, что наблюдаемые эффекты обусловлены перестройками актинового цитоскелета, инициированными деструкцией рафтов — богатых холестерином липидных микродоменов.

Как нам представляется, результаты настоящей работы находят логичное объяснение на основе современных представлений о латеральной гетерогенности клеточных мембран (Brown, London, 2000; Brown, 2006; Pike, 2009). Распространенным методическим приемом для выявления роли липидных микродоменов (рафтов, кавеол) в различных сигнальных процессах является снижение содержания холестерина в клетках, т. е. эксперименты в условиях деструкции рафтов (см.: Zidovetzki, Levitan, 2007; Сударикова и др., 2009; Pike, 2009). Такой подход был реализован и в наших исследованиях, направленных на выяснение природы лигандов на поверхности трансформированных клеток и в конечном счете молекулярных основ системы естественного иммунитета. Полученные данные

позволяют сделать вывод о том, что целостность липидных рафтов в мембране интактных клеток-мишеней — это необходимое условие для их взаимодействия с ЕКК (клетками-эффекторами). Нарушения структуры рафтов в клетках-мишенях с пониженным уровнем холестерина (после обработки МБЦД), по-видимому, сопровождаются такими изменениями клеточной поверхности, которые приводят к утрате их чувствительности к действию ЕКК.

Об изменении поверхности клеток K562 и переразделении маркера рафтов — ганглиозида GM1 — после экстракции холестерина свидетельствуют и данные флуоресцентной микроскопии (рис. 1). В настоящее время возможности визуализации рафтов, размеры которых, как правило, не превышают десятков нанометров, весьма ограничены (Henderson et al., 2005). Окрашивание ганглиозида GM1 с использованием субъединицы холерного токсина является одним из немногих методов, позволяющих хотя бы косвенно судить о динамике рафтов в клеточных мембранах. Существуют данные, свидетельствующие о том, что деструкция или модификация липидных микродоменов приводит к увеличению латеральной диффузии ганглиозида GM1 (Bang et al., 2005), что может приводить к обнаруженным изменениям флуоресценции. Кроме того, высказывались предположения о возможном выходе ганглиозида GM1 из мембраны вследствие экстракции холестерина при действии МБЦД (Lai et al., 2008).

Будучи гликофинголипидами, GM1, как и другие ганглиозиды, являются типичными компонентами липидных рафтов в нативных клетках (Sonnino et al., 2006). В связи с этим следует отметить, что ганглиозиды достаточно давно привлекали внимание иммунологов как высокоаффинные мембранные молекулы, возможно выполняющие маркерные функции (см., например: Дятловицкая, 1998). Наши данные согласуются с представлением о ганглиозидах как вероятных мишеневых детерминантах в составе рафтов на поверхности опухолевых клеток. Ранее сообщалось о возможной роли GM2 и повышенном уровне ганглиозидов в культивируемых клетках линии K562 (Ando et al., 1987; Dougall et al., 1987). Есть основания считать, что ганглиозиды выполняют также функцию мишеней для ряда вирусных и бактериальных патогенов, инвазия которых в эукариотические клетки может зависеть от уровня холестерина и организации рафтов в плазматической мембране (Lai et al., 2008).

Анализ данных литературы о других предполагаемых лигандах, распознаваемых ЕКК, позволяет считать, что наиболее вероятные кандидаты гликопротеидной природы относятся к группе гликозил-фосфатидилинозитол-связанных белков (GPI-anchored proteins). Как правило, GPI-заякоренные белки обнаруживаются исключительно в составе богатых холестерином и сфинголипидами мембранных микродоменов — рафтов (Brown, 2006; Pike, 2009). Вообще, исследования GPI-связанных белков развивались в тесной связи с представлениями о липидных рафтах и так называемых детергент-устойчивых мембранах (detergent-resistant membranes, DRM) (Brown, Rose, 1992; Brown, London, 2000; Pike, 2003). Поэтому тем более интересны данные о том, что потенциальные молекулярные мишени на поверхности опухолевых клеток — CD48 и CD59 — представляют собой GPI-связанные белки, активность которых, по-видимому, реализуется только в составе рафтов (Watzl, Long, 2003; Omidvar et al., 2006). Наши результаты согласуются с исследованиями функциональной экспрессии CD59 в клетках K562 и U937 (Omidvar et al., 2006); цитируемая работа — одна из еди-

ничных за последнее десятилетие, адресованных изучению молекулярной структуры и функции лигандов на поверхности клеток-мишеней. Обобщая литературные и собственные данные, можно предположить, что чувствительность клеток K562 к действию естественных киллеров в значительной степени определяется взаимодействием CD59 с рецепторами ЕКК и поэтому зависит от целостности липидных рафтов в плазматической мембране.

Следует упомянуть достаточно распространенную точку зрения, согласно которой на поверхности клеточных мишеней нет универсальных молекулярных детерминант, распознаваемых всеми клонами ЕКК (Trinchieri, 1989). В этом случае цитотоксическое действие ЕКК также могло бы зависеть от структуры рафтов, выполняющих функцию скаффолда во многих сигнальных процессах и, возможно, обеспечивающих колоколизацию низкоаффинных лигандов на поверхности клетки. В связи с этим заслуживают внимания предположения о возможной роли молекул адгезии и рецепторов к белкам внеклеточного матрикса в обеспечении иммунного взаимодействия клеток-мишеней и эффекторов (Takeda, Okumura, 2004). Так, сообщается о присутствии рецепторов к ламинину на поверхности клеток K562 и их необходимом участии в цитоллизе ЕКК (Филатова и др., 2008б). Показано также, что чувствительность трансформированных фибробластов к действию ЕКК зависит от активности матричных металлопротеаз (Филатова и др., 2009). С другой стороны, известны результаты многочисленных исследований, которые указывают на роль рафтов в процессах адгезии и функционировании интегриновых рецепторных комплексов (Leitinger, Hoggel, 2002).

В то время как вопрос о природе мембранных лигандов остается открытым, имеется целый ряд данных, свидетельствующих о модулирующем влиянии различных факторов на чувствительность трансформированных клеток к литическому действию ЕКК. Так, снижение цитотоксичности наблюдалось при достаточно разнородных воздействиях, в том числе разборке актинового цитоскелета, обработке различными антиоксидантами (Филатова и др., 2006, 2008а, 2009). Сравнение и обнаруженное сходство эффектов, однако, не позволяют судить о мембранных механизмах, которые остаются неясными. Возможно, рассматриваемые результаты могут быть рационально объяснены на основе предположений о роли липидных микродоменов (рафтов, кавеол) и их целостности для взаимодействия киллерных клеток-эффекторов с трансформированными клетками-мишенями.

Авторы благодарят Н. П. Терюкову за полезные консультации и помощь в измерениях концентрации холестерина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00574) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Дятловицкая Э. В. 1998. Сфинголипиды и рак. Биоорганическая химия. 24 (10) : 723—730.
- Сударикова А. В., Чубинский-Надеждин В. И., Негуляев Ю. А., Морачевская Е. А. 2009. Функциональные свойства натриевых каналов в клетках K562 после экстракции холестерина. Цитология. 51 (8) : 676—683.

- Филатова Н. А., Курпичникова К. М., Вахромова Е. А., Гамалей И. А. 2009. Влияние альфа-липоевой кислоты на чувствительность трансформированных фибробластов к литической активности естественных киллерных клеток. Сравнение с действием НАС. Цитология. 51 (5) : 398—402.
- Филатова Н. А., Курпичникова К. М., Гамалей И. А. 2006. Уменьшение активности естественных киллеров по отношению к трансформированным фибробластам 3Т3-SV40, обработанным N-ацетилцистеином. Цитология. 48 (5) : 438—442.
- Филатова Н. А., Курпичникова К. М., Гамалей И. А. 2008а. Реорганизация актинового цитоскелета в клетках 3Т3-SV40 и их чувствительность к литической активности естественных киллерных клеток. Цитология. 50 (3) : 261—268.
- Филатова Н. А., Тюряева И. И., Иванов В. А. 2008б. Распознавание и лизис естественными киллерами опухолевых клеток при участии ламинина. Цитология. 50 (1) : 72—78.
- Ando I., Hoon D. S. B., Suzuki Y. 1987. Ganglioside GM2 on the K562 cell line is recognized as a target structure by human natural killer cells. *Int. J. Cancer*. 40: 12—17.
- Bang B., Gniadecki R., Gajkowska R. 2005. Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 14 : 266—272.
- Bowlin T. L., Rosenberger A., Stemerick D., Edwards M. L. 1990. Potentiation of natural killer cell activity and tumor immunity by diacetylputrescine. *Cancer Res.* 50 : 5460—5463.
- Brown D. A. 2006. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Amer. J. Physiol.* 21 : 430—439.
- Brown D. A., London E. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275 : 17 221—17 224.
- Brown D. A., Rose J. K. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* 68 : 533—544.
- Brown M. H., Boles K., Van der Merwe P. A., Kumar V., Mathew P. A., Barclay A. N. 1998. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J. Exp. Med.* 188 : 2083—2090.
- Byfield F. J., Aranda-Espinoza H., Romanenko V. G., Rothblatt G. H., Levitan I. 2004. Cholesterol depletion increases membrane stiffness of aortic endothelial cells. *Biophys. J.* 87 : 3336—3343.
- Chichili G. R., Rodgers W. 2009. Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cell Mol. Life Sci.* 66 : 2319—2328.
- Christian A. E., Haynes M. P., Phillips M. C., Rothblatt G. H. 1997. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.* 38 : 2264—2272.
- Dougall S. L., Schwarting G. A., Parkinson D., Sullivan A. K. 1987. Increased fucosylation of glycolipids in human leukaemia cell line (K562-Clone I) with decreased sensitivity to NK-mediated lysis. *Immunology.* 62 : 75—80.
- Haeflner E. W., Kolbe K., Schroeter D., Paweletz N. 1980. Isolation of a light and a heavy membrane-fraction of the glucogen-free Ehrlich—Lettré substain. *Biochem. biophys. acta.* 603 : 36—51.
- Harder T., Simons K. 1999. Clusters of glycolipid and glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in lymphoid cells: accumulation of actin regulated by local tyrosine phosphorylation. *Eur. J. Immunol.* 29 : 556—562.
- Hashimoto Y., Sudo H. 1971. Evaluation of cell damage in immune reactions by release of radioactivity from ³H-uridine labeled cells. *Gann.* 62 : 139—145.
- Henderson R. M., Edwardson J. M., Geisse N. A., Saslowky D. E. 2005. Lipid rafts: feeling is believing. *News Physiol. Sci.* 19 : 39—43.
- Katagiri Y. U., Kiyokawa N., Fujimoto J. 2001. A role for lipid rafts in immune cell signaling. *Microbiol. Immunol.* 45 : 1—8.
- Kondadasula S. V., Roda J. M., Parihar R., Yu J., Lehman A., Caligiuri M. A., Tridandapani S., Burry R. W., Carson W. E. 2008. Colocalization of the IL-12 receptor and FcγRIIIa to natural killer cell lipid rafts leads to activation of ERK and enhanced production of interferon-gamma. *Blood.* 111 : 4173—4183.
- Kuziemko G., Stroh M., Stevens R. 1996. Cholera toxin binding affinity and specificity for gangliosides determined by surface plasmon resonance. *Biochemistry.* 35 : 6375—6384.
- Kwik J., Boyle S., Fooksman D., Margolis L., Sheetz M. P., Edidin M. 2003. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 100 : 13 964—13 969.
- Lai C. H., Chang Y. C., Du S. Y., Wang H. J., Kuo C. H., Fang S. H., Fu H. W., Lin H. H., Chiang A. S., Wang W. C. 2008. Cholesterol depletion reduces *Helicobacter pylori* CagA translocation and CagA-induced responses in AGS cells. *Infect. Immun.* 76 : 3293—3303.
- Lanier L. L. 2005. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23 : 225—274.
- Latchman Y., McKay P. F., Reiser H. 1998. Identification of the 2B4 molecule as a counter-receptor for CD48. *J. Immunol.* 161 : 5809—5812.
- Leitinger B., Hoggl N. 2002. The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. *J. Cell Sci.* 115 : 963—972.
- Lencer W., Tsai B. 2003. The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. *Trends Biochem. Sci.* 28 : 639—645.
- Lou Z., Jevremovic D., Billadeau D. D., Leibson P. J. 2000. A balance between positive and negative signals in cytotoxic lymphocytes regulates the polarization of lipid rafts during the development of cell-mediated killing. *J. Exp. Med.* 191 : 347—354.
- Mannechez A., Reungpatthanaphong P., de Certaines J. D., Leray G., Le Moyec L. 2005. Proton NMR visible mobile lipid signals in sensitive and multidrug-resistant K562 cells are modulated by rafts. *Cancer Cell Int.* 5 : 2 doi : 10.1186/1475-2867-5-2.
- Mattes M. J., Sharrow S. O., Herberman R. B., Holden H. T. 1979. Identification and separation of Thy-1 positive mouse spleen cells active in natural cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 123 : 2851—2860.
- Morachevskaya E. A., Sudarikova A. V., Negulyaev Y. A. 2007. Mechanosensitive channel activity and F-actin organization in cholesterol-depleted human leukaemia cells. *Cell Biol. Int.* 31 : 374—381.
- Omidvar N., Wang E. C., Brennan P., Longhi M. P., Smith R. A., Morgan B. P. 2006. Expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored CD59 on target cells enhances human NK cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 176 : 2915—2923.
- Pierce S. K. 2002. Lipid rafts and B-cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2 : 96—105.
- Pike L. J. 2003. Lipid rafts — bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* 44 : 655—667.
- Pike L. J. 2009. The challenge of lipid rafts. *J. Lipid Res.* 50 : 323—328.
- Riteau B., Barber D. F., Long E. O. 2003. Vav1 phosphorylation is induced by beta2 integrin engagement on natural killer cells upstream of actin cytoskeleton and lipid raft reorganization. *J. Exp. Med.* 198 : 469—474.
- Sonnino S., Mauri L., Chigorno V., Prinetti A. 2006. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology.* 17 : 1—13.
- Takeda K., Okumura K. 2004. CAM and NK cells. *eCAM.* 1 : 17—27.
- Trinchieri G. 1989. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 47 : 187—376.
- Watzl C., Long E. O. 2003. Natural killer cell inhibitory receptors block actin cytoskeleton-dependent recruitment of 2B4 (CD244) to lipid rafts. *J. Exp. Med.* 197 : 77—85.
- Zidovetzki R., Levitan I. 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. biophys. acta.* 1768 : 1311—1324.

SENSITIVITY TO LYSIS BY NATURAL KILLERS DEPENDS ON THE INTEGRITY OF LIPID RAFTS
IN PLASMA MEMBRANE OF TRANSFORMED CELLS*N. A. Filatova, V. I. Chubinskij-Nadezhdin, V. A. Ivanov, E. A. Morachevskaya¹*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: elenmo@mail.cytspb.rssi.ru

The present work focused on the role of cholesterol-rich membrane microdomains (rafts) in cellular mechanisms of innate immunity and anticancer defence. The lytic effect of natural killers (NK) was examined in dependence on cholesterol content in transformed target cells. In the current study, K562 human erythroleukaemia cells were the targets. K562 cells were treated with methyl-beta-cyclodextrin (MbCD) to deplete membrane cholesterol that was verified by enzymatic method. With the use of ³H-uridine test, NK (mouse splenocytes) cytotoxicity was estimated under various conditions, specifically, after incubation of K562 cells with MbCD or inactive analog alpha-cyclodextrin. The data obtained show that cholesterol-depleting treatment (2.5 or 5 mM MbCD) of target cells results in full loss of their sensitivity to NK lysis. The effect is likely to be due to disintegrity of lipid rafts that is critically dependent on the level of membrane cholesterol. Visualization of cell surface changes by fluorescent labeling of ganglioside GM1 confirmed our conclusions.

Key words: plasma membrane, natural killers, cholesterol, lipid rafts, human leukaemia K562 cells, methyl-beta-cyclodextrin, alpha-cyclodextrin.
