



УДК 616.111:577.112.85

ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ МИШЕЙ ДИКОГО ТИПУ ТА МИШЕЙ ІЗ НОКАУТОМ ГЕНА *PTTG*

О. П. Канюка¹, Є. З. Філяк², Н. О. Сибірна¹

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

²Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна

Проведено визначення впливу нокауту гена *pttg* на агрегаційну здатність еритроцитів, індуковану сіалоспецифічними лектинами SNA і MAA II та органічним барвником – альцjanовим синім. Показано, що зміни функціонального стану еритроцитів за умови нокауту даного гена супроводжуються зміною типу зв'язку та кількості сіалових кислот у складі вуглеводних компонентів глікокон'югатів плазматичної мембрани.

Ключові слова: сіалові кислоти, еритроцити, агрегація.

ВСТУП

Поверхневий рецепторний апарат клітинної мембрани є однією з найважливіших систем, що забезпечує життєдіяльність клітини. Кількість рецепторів за різних умов функціонування клітини може змінюватись, але їхня структура залишається відносно стабільною. Вона представлена переважно глікопротеїнами, вуглеводна частина яких у вигляді олігосахаридних ланцюгів утворює надмембранні комплекси. Вони відіграють ключову роль у механізмах міграції, адгезії, проліферації та апоптозу клітин [4, 5, 7]. Однак при різних патологічних станах можливі зміни кількісних та якісних характеристик поверхневих глікокон'югатів клітин [8].

Попередніми дослідженнями було показано, що ген *pttg* (Pituitary Tumor Transforming Gene) відіграє значну роль у гемопоезі [12], а також є дані про те, що він може опосередковано впливати на шляхи везикулярного транспорту в апараті Гольджі та на його секреторну функцію [10].

Метою нашої роботи було дослідити вплив нокауту гена *pttg* на структурно-функціональний стан поверхнево-рецепторного апарату плазматичної мембрани червоних кров'яних тілець.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У досліджах використовували гепаринізовану кров (кінцеве розведення – гепарин : цільна кров = 1:100) мишей лінії BL6/C57 дикого типу (*pttg*-WT) і мишей

з нокаутом гена *pttg* (*pttg*-KO). Мишей із спрямованою інактивацією (нокаутом) гена *pttg* було отримано із науково-дослідного інституту при медичному центрі „Синайський кедр” (Лос-Анджелес, США). Нокаут гена *pttg* було здійснено шляхом заміни частини гена *pttg* (частини першого екзону і повністю другий та третій екзони) на ген резистентності до неоміцину в ембріональних, стовбурових J1 клітинах миші, отримані стабільно трансфіковані клони цих клітин було введено мікроін’єкцією у бластоцист мишей. Химерних мишей схрещували із мишами лінії BL6/C57, отримуючи в результаті гетерозиготне потомство у розщепленні 1:2. При схрещуванні гетерозиготних особин було отримано гомозиготних особин (*pttg*-WT та *pttg*-KO) у розщепленні 1:2:1, генотип котрих визначали методом полімеразної ланцюгової реакції із використанням специфічних генних праймерів.

Агрегаційну здатність еритроцитів досліджували турбідиметричним методом [2] за допомогою двоканального лазерного аналізатора агрегації „LA 230” (НВФ „БИОЛА”, Росія) в суспензії відмитих еритроцитів у концентрації $4,2 \times 10^6$ клітин в 1 мл при $+37^\circ\text{C}$ і перемішуванні зі швидкістю 200 об/хв. Метод ґрунтується на тому, що відносна дисперсія коливань оптичної густини, викликаних випадковими змінами кількості агрегатів, що потрапляють на шлях лазерного променя, відображає відхилення від їхнього середнього розміру, ступінь асоціації. Максимальну швидкість агрегації визначали як максимальний нахил кривої світлопропускання після додавання індуктора і виражали у відсотках за 1 хв. Максимальний ступінь агрегації визначали як максимальне значення світлопропускання після додавання індуктора і виражали у відсотках. Як індуктор агрегації використовували альціановий синій у концентрації 7 мкг/мл та лектини *Maackia amurensis* („Лектинотест”, Україна) і *Sambucus nigra* („Sigma”, США) у концентрації 10 мкг/мл.

- **MAA** – лектин акації амурської (афінний до послідовності NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 3$) DGal/DgalNAc, не зв’язує при цьому дисахаридних фрагментів, зв’язаних ($\alpha 2 \rightarrow 6$) глікозидним зв’язком);
- **SNA** – лектин бузини чорної (специфічний до послідовності NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 6$) DGal/DgalNAc, не зв’язує при цьому NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 3$)DGal/DgalNAc послідовності в олігосахаридах).

Загальний вміст сіалових кислот у мембранах еритроцитів визначали методом Ворена [13]. Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Електрокінетичним властивостям еритроцитів як одному з життєво важливих параметрів гомеостазу організму приділяється підвищена увага. В нормі еритроцити несуть від’ємний заряд і відштовхуються один від одного, що забезпечує виконання ними важливих фізіологічних функцій: взаємодія клітин між собою, газообмін, адсорбція амінокислот, білків і продуктів їхнього розпаду, антигенів, антитіл, ферментів і т. д. Електричний заряд клітини відносно постійний у нормі та значно змінюється за умов патології. Наприклад, зниження негативного заряду супроводжується підвищенням агрегації еритроцитів, що свідчить про порушення реологічних властивостей крові (змін в’язкості і структури крові) та, як наслідок, ініціації процесу тромбоутворення [3]. На значення електричного заряду еритроцитів

впливають різноманітні фактори мікрооточення: рН, температура, наявність на їхній поверхні токсичних сполук тощо. Динаміку зміни цього показника ми оцінювали, використовуючи метод альціаніндукованої агрегації еритроцитів. Альціановий синій (*Alcian blue*) – органічний барвник, молекула якого має позитивний заряд і вступає в електростатичні взаємодії з кислими мукополісахаридами плазматичної мембрани клітини [7].

У результаті проведених досліджень альціаніндукованої агрегації еритроцитів виявлено, що у мишей із нокаутом гена *pttg* спостерігається збільшення ступеня агрегації на 18%, швидкості агрегації на 60% та максимального розміру агрегату на 28% (рис. 1, таблиця) порівняно з мишами дикого типу. На нашу думку, це пов'язано зі зміною поверхневого заряду мембрани еритроцитів за даних умов. Відомо, що зміна поверхневого заряду еритроцитів може бути результатом або екранування негативно заряджених поверхневих залишків, або перерозподілу внеску окремих груп у значення електрокінетичного потенціалу [3].

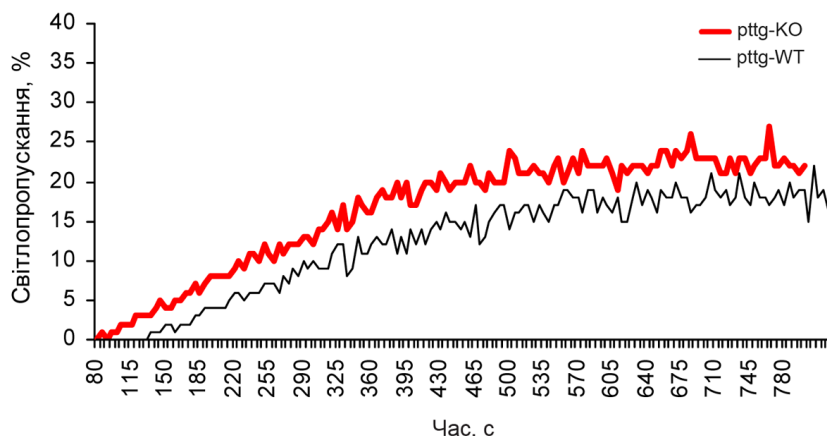


Рис. 1. Типові криві агрегації еритроцитів при використанні у ролі індуктора агрегації альціанового синього у *pttg*-WT і *pttg*-KO мишей

Fig. 1. Typical curves of erythrocytes aggregation induced by Alcian blue in the *pttg*-WT and *pttg*-KO mice

Заряд поверхні плазматичної мембрани еритроцитів залежить від вмісту в її структурі вуглеводних компонентів мембранних глікокон'югатів сіалових кислот, які більш ніж на 60% визначають сумарний негативний заряд. Зниження рівня сіалових кислот може бути як абсолютним (наприклад, алкоголь різко знижує кількість сіалових кислот; а віруси мають нейрамінідазну активність), так і відносним (екранування сіалових кислот високомолекулярними білками, які адсорбуються на поверхні еритроцитів з плазми) [6]. Структура вуглеводних компонентів мембрани є сигналом для розпізнавання старіючих або пошкоджених еритроцитів для подальшого видалення їх із кров'яного руслу. Десіалювання вуглеводних компонентів призводить до захоплення еритроцитів галактозоспецифічними лектинами в печінці та видалення їх із кров'яного руслу [9]. Пошкоджені еритроцити впізнаються також рецепторами макрофагів, лігандом для яких є сіалолігосахаридні ланцюги кластеризованого або агрегованого глікофорину [11].

Різнманіття сіалогліканів виявляється у різних зв'язках сіалових кислот зі субтермальними вуглеводами. У наших дослідженнях для порівняння кількості

залишків сіалових кислот, приєднаних до субтермінального залишку моносахариду, яким найчастіше виступає галактоза, $\alpha 2 \rightarrow 3$ та $\alpha 2 \rightarrow 6$ глікозидним зв'язком на поверхні еритроцитарної мембрани, як індуктори агрегації було використано сіалоспецифічні лектини MAA II та SNA.

Аглютинацію клітин лектинами пояснюють формуванням між клітинами молекулярних місточків, завдяки яким утворюються багатоклітинні агрегати. Їхнє формування стає можливим завдяки наявності у клітинах на поверхні великої кількості вуглеводів у складі глікокон'югатів, а у лектинів – двох і більше центрів зв'язування відповідних карбогідратів [1].

Найвиразніша динаміка змін у бік збільшення показників лектиніндукованої агрегації еритроцитів мишей *pttg*-KO спостерігалася при використанні лектину MAA (таблиця, рис. 2): ступінь агрегації зростав на 48%, швидкість агрегації збільшувалася на 50%, максимальний розмір агрегату – на 40% порівняно з еритроцитами мишей *pttg*-WT. Це може свідчити про підвищення рівня експресії глікопротеїнів на поверхні клітин, комплементарних до цього лектину.

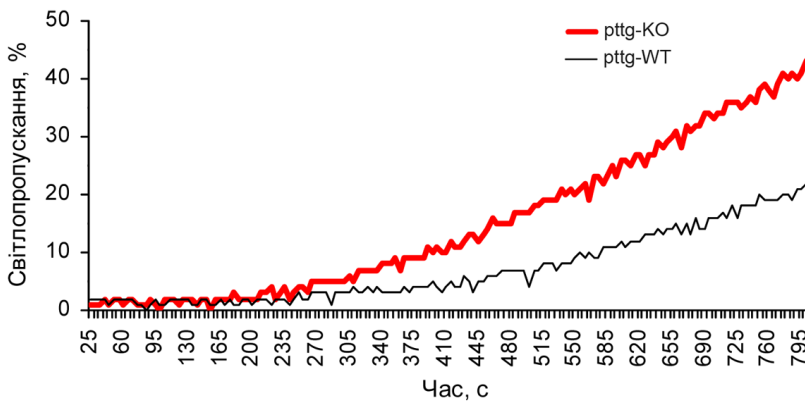


Рис. 2. Типові криві агрегації еритроцитів при використанні у ролі індуктора агрегації лектину в *pttg*-WT і *pttg*-KO мишей

Fig. 2. Typical curves of erythrocytes aggregation induced by lectin MAA in *pttg*-WT and *pttg*-KO mice

Менш виражені зміни показників агрегації еритроцитів спостерігалися при використанні SNA. Хоча, як і у попередньому випадку, спостерігалася зростання показників агрегації еритроцитів мишей із нокаутом гена *pttg* порівняно з еритроцитами мишей *pttg*-WT. Наведені дані вказують на те, що на мембрані еритроцитів як мишей дикого типу, так і мишей з нокаутом даного гена переважають глікопротеїнові рецептори, що містять вуглеводні детермінанти, у структурі яких сіалові кислоти приєднані $\alpha 2 \rightarrow 3$ глікозидним зв'язком, і незначну кількість сіалових кислот, з'єднаних $\alpha 2 \rightarrow 6$ глікозидним зв'язком із галактозою.

Якщо порівнювати показники лектиніндукованої та альціаніндукованої агрегації еритроцитів, то видно, що вони відрізняються. Ці відмінності можна пояснити тим, що ініціація агрегації лектинами не відбувається при прямому зв'язуванні їх з вуглеводними детермінантами, а визначається процесами кластеризації мембранних рецепторів глікопротеїнової природи. Різницю між максимальними розмірами агрегату при лектиніндукованій та при альціаніндукованій агрегації можна пояснити різною природою сил, які беруть участь в утворенні агрегату.

Переважаючими силами, які задіяні у процесах альціаніндукованої агрегації, є електростатичні сили, натомість у процесах лектиніндукованої агрегації вирішальним є утворення міжмолекулярних зв'язків [1].

Показники агрегації еритроцитів при використанні альціанового синього та лектинів МАА II і SNA як індукторів агрегації у *pttg*-WT і *pttg*-KO мишей ($M \pm m$; $n = 10-12$)
Indicators of alcian blue and lectin-induced aggregation of erythrocytes of *pttg*-WT and *pttg*-KO mice ($M \pm m$; $n = 10-12$)

Індуктор агрегації	Варіант досліду	Максимальний розмір агрегату, у.о.	Час початку агрегації, с	Ступінь агрегації, %	Швидкість агрегації, %/хв
Alcian blue	<i>pttg</i> -WT	1,8±0,6	80±5	22±0,83	3,04±0,46
	<i>pttg</i> -KO	2,5±0,2	75±6,3	27±0,5	5,06±1,2
Лектин МАА II	<i>pttg</i> -WT	4,7±0,1	50±9,5	23±0,53	4±0,22
	<i>pttg</i> -KO	5,7±0,3	30±4,45	45±0,9	7,4±0,17
Лектин SNA	<i>pttg</i> -WT	3,0±0,2	60±2,3	20±1,8	2±2,3
	<i>pttg</i> -KO	4,4±0,5	85±3	26±4,2	2,9±5,4

Формування поверхневого рецепторного комплексу клітин крові у процесі нормального розвитку супроводжується сіалюванням олігосахаридів і маскуванням субтермінальних залишків моноцукрів. Для кращого розуміння внеску сіалових кислот у створення негативного поверхневого заряду на мембрані еритроцитів було проведено десіалювання цих клітин нейромінідазою *Clostridium perfringens* (Sigma), яка відщеплює термінальні сіалові кислоти, з'єднані $\alpha 2 \rightarrow 3$, $\alpha 2 \rightarrow 6$ та $\alpha 2 \rightarrow 8$ глікозидним зв'язком з Gal, GlcNac, GalNac, AcNeu, GlcNeu олігосахаридів, у складі гліколіпідів і глікопротеїнів. Після обробки еритроцитів нейрамінідазою показники альціаніндукованої агрегації у мишей *pttg*-WT зменшилися на 80%, у той же час у мишей *pttg*-KO показники зменшилися тільки на 50%, що свідчить про зниження рівня сіалювання глікокон'югатів еритроцитів за умов нокауту гена *pttg*. Еритроцити мишей як *pttg*-WT, так і *pttg*-KO, попередньо оброблені нейрамінідазою, втрачали здатність до агрегації у присутності всіх застосованих лектинів. З отриманих результатів можна зробити висновок, що поверхневий негативний заряд еритроцитів мишей дикого типу на 80% залежить від загального вмісту сіалових кислот, у цей же час в еритроцитах мишей з нокаутом гена *pttg* вклад сіалових кислот у створення цього заряду лише 50%.

При дослідженні загального вмісту сіалових кислот у мембранах еритроцитів було встановлено, що у мишей *pttg*-KO відбувається зменшення загальної кількості сіалових кислот на 25% порівняно з мишами *pttg*-WT (рис. 3), що узгоджується з висновками вищеописаних експериментів після обробки нейрамінідазою. Порівнюючи загальний вміст сіалових кислот і показники лектиніндукованої

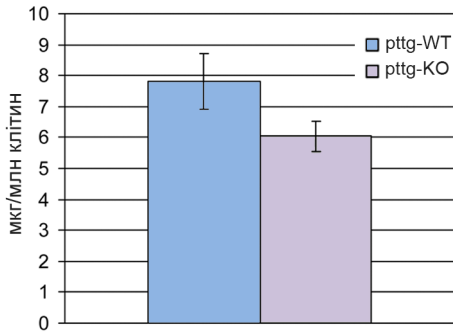


Рис. 3. Вміст сіалових кислот в еритроцитах *pttg*-WT і *pttg*-KO мишей

Fig. 3. Content of sialic acids in erythrocytes of *pttg*-WT and *pttg*-KO mice

агрегації, можна стверджувати, що у мембранах еритроцитів мишей відбувається перерозподіл сіаловмісних вуглеводних детермінант у складі гліколіпідів і глікопротеїнів. Зростання показників лектиніндукованої агрегації еритроцитів мишей *pttg*-KO порівняно з мишами дикого типу можна пояснити тим, що лектини пріоритетно зв'язуються зі сіаловими кислотами у складі глікопротеїнів, а їхня взаємодія з гліколіпідними карбогідратами утруднена в основному топологічними причинами, оскільки гліколіпіди перебувають у нижніх шарах глікока-

ліксу. Загальний вміст сіалових кислот визначається кількістю вуглеводних компонентів у складі як глікопротеїнів, так і гліколіпідів, і тому зниження цього показника у наших дослідженнях можна пов'язати із втратою кількості сіалових кислот саме у складі гліколіпідних представників глікокон'югатів в еритроцитах мишей з нокаутом гена *pttg*.

Зміна кількості сіалових кислот на поверхні клітини призводить до збільшення їхніх адгезивних властивостей. Вивчення рецепторної функції клітин дало змогу встановити, що поверхневі глікокон'югати з кінцевими залишками D-галактози з'являються в ситуаціях, коли взаємодія між клітинами потребує високого ступеня авідності (наприклад, елімінація дефектних клітин системою мононуклеарів і т. п.) [8].

Таким чином, виходячи з аналізу отриманих експериментальних даних при дослідженні агрегаційної здатності еритроцитів із використанням у ролі індукторів агрегації альціанового синього та сіалоспецифічних лектинів, можна зробити висновок, що за відсутності гена *pttg* спостерігається перерозподіл як кількості сіаловмісних олігосахаридів між глікопротеїнами та гліколіпідами, так і зміна типу зв'язку, яким приєднується термінальний залишок у вуглеводній детермінанті. Підвищення агрегаційної здатності еритроцитів мишей *pttg*-KO у відповідь на індукуючий вплив лектину MAA свідчить про зростання кількості дисахардів NeuNAc(α 2 \rightarrow 3)DGal/DgalNAc. Таким чином, основний вклад у формування поверхневого негативного заряду мембрани червоних клітин крові у мишей *pttg*-KO вносять залишки сіалових кислот, з'єднаних α 2 \rightarrow 3-глікозидним зв'язком з галактозою.

Виявлені нами порушення у динамічних і кінетичних показниках агрегації, а також у загальному вмісті сіалових кислот еритроцитів мишей з нокаутом гена *pttg* свідчать про перебудови у структурі вуглеводних детермінант глікокон'югатів і є підґрунтям змін функціонального стану еритроцитів у досліджуваній моделі.

1. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела. Львів: ПП „Кварт”, 2005. 554 с.
2. Булегенов К.Е., Балмуханов Б.С. Агрегация эритроцитов в присутствии альцианового голубого. *Кардиология*, 1993; 3: 42–44.

3. Крылов В. Н. Влияние низкоинтенсивного эми квч-диапазона на некоторые показатели гомеостаза животных. Вестник Нижегородского университета им. Лобачевского. Сер. Биология. Вып. 1(6). Электромагнитные поля и излучения в биологии и медицине. Н. Новгород: Изд-во ННГУ, 2003: 14–24.
4. Молчанова Т.П. Основы молекулярной организации белков мембраны эритроцитов и их дефекты, приводящие к гемолитическим анемиям. Гематолог. и трансфузиол, 1989; 7: 32–41.
5. Николаева Т.Л., Оловникова Н.И. Система Кидд и ее трансфузиологическое значение. Гематол. и трансфузиол, 2006; 51(1): 33–35.
6. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степлова Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Изд-во ТГУ, 2004. 202 с.
7. Сибірна Н.О., Буслик Т.В. Глікопротеїни мембран еритроцитів та будова їхніх вуглеводних детермінант. Біологічні студії, 2009; 3(1): 79–94.
8. Хижняк О.М., Стекленьева Н.І. Характеристика поверхневих глікокон'югатів клітин крові при захворюваннях на аденому та рак щитоподібної залози. Морфологія, 2007; 1(2): 91–94.
9. Aminoff D. The role sialoglycoconjugates in the ageing and sequestration of red cells from circulation. Blood Cells, 1988; 14: 229-257.
10. Васас М., Fusco С., Planche А. et al. Securin and separase modulate membrane traffic by affecting endosomal acidification. Traffic, 2011; 12 (5): 615–626.
11. Beppu M., Hayashi T., Hasegawa T., Kikugawa K. Recognition of sialosaccharide chains of glycophorin on damaged erythrocytes by macrophage scavenger receptors. Biochim. Biophys. Acta, 1995; 1268(1): 9–19.
12. Dominguez A., Ramos-Morales F., Romero F. et al. Hpttg, a human homologue of rat pttg, is overexpressed in hematopoietic neoplasms. Evidence for a transcriptional activation function of hPTTG. Oncogene, 1998; 17(17): 2187–2193.
13. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J. Biol. Chem, 1959; 234: 1971–1975.

PECULIARITIES OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION OF ERYTHROCYTE MEMBRANES IN MICE OF WILD-TYPE AND MICE WITH PTTG GENE KNOCKOUT

O. P. Kanyuka¹, YE. Z. Filyak², N. A. Sybirna¹

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine
Institute of Cell Biology NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine

The effect of *pttg* gene knockout forwards on aggregation ability of erythrocytes induced by specific lectins SNA and MAA II and organic dye alcian blue was studied. It was shown that changes in functional state of erythrocytes at the knockout of this gene are accompanied by changes in bond type and quantity of sialic acids in glycoconjugates of plasma membrane.

Key words: Sialic acids, red blood cells, aggregation.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ МЫШЕЙ ДИКОГО ТИПА И МЫШЕЙ С НОКАУТОМ ГЕНА *PTTG*

О. П. Канюка¹, Є. З. Філяк², Н. А. Сибірна¹

¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

²Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова,
14–16, Львов 79005, Украина

Проведено определение влияния нокаута гена *pttg* на агрегационную способность эритроцитов, индуцированную сиалоспецифическими лектинами SNA и MAA II и органическим красителем – альциановым синим. Показано, что изменения функционального состояния эритроцитов при условии нокаута данного гена сопровождаются изменением типа связи и количества сиаловых кислот в составе углеводных компонентов гликоконъюгатов плазматической мембраны.

Ключевые слова: сиаловые кислоты, эритроциты, агрегация.

Одержано: 07.04.2011