

ЭКСПРЕССИЯ ИНТЕГРИНОВ В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО СУБСТРАТНОЙ ЗАВИСИМОСТИ АПОПТОЗА.

Г.Е.МОРОЗЕВИЧ, Н.И.КОЗЛОВА, А.Е.БЕРМАН

НИИ биомедицинской химии РАМН, Москва, 119832, Россия, факс: (095) 245-0857

Из линии клеток Сасо-2 карциномы кишечника человека, характеризующихся субстратной зависимостью апоптоза (аноикис-положительные клетки, т.е. клетки, подвергающихся апоптозу при нарушении их связи с субстратом - белками внеклеточного матрикса), получена популяция аноикис-отрицательных клеток, сохраняющих жизнеспособность при блокировании матрикс-клеточного взаимодействия. В опытах по клеточной адгезии показано, что аноикис-отрицательная популяция обладает существенно меньшим сродством к фибронектину, по сравнению с аноикис-положительными клетками, но не отличается от последних по сродству к нативному и денатурированному коллагену и ламинину. При исследовании спектра интегринов, экспрессированных на клеточной поверхности (в плазматической мембране), установлено, что аноикис-отрицательные клетки характеризуются существенно меньшей экспрессией интегринов $\alpha_v\beta_1$ и $\alpha_v\beta_3$. По экспрессии интегринов $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ и $\alpha_6\beta_1$ исследуемые популяции не различаются. Предложенный способ получения близких по происхождению, но различающихся по субстратной зависимости апоптоза клеточных популяций представляет удобную модель для изучения механизмов апоптотической гибели клеток и роли интегринов в этом процессе.

Ключевые слова: интегрины, апоптоз, субстратная зависимость, аноикис, клеточная адгезия

ВВЕДЕНИЕ. Апоптоз - генетически запрограммированная гибель клеток - реализуется в ходе последовательных внутриклеточных событий (экспрессия специфических генов, протеолитическое расщепление определенных белков, активизация специфических нуклеаз и др.) и находится под контролем множества внеклеточных воздействий (гормонов, цитокинов, стимуляторов и ингибиторов протеин-фосфокиназ и др.) [1-3]. Среди внеклеточных факторов, регулирующих апоптоз, все большее внимание в последнее время уделяется сигналам, генерируемым при взаимодействии клеток с внеклеточным матриксом (ВМ) [4-6]. В частности, предполагается [4,7], что интегрины - матрикс-специфические рецепторы поверхностной (плазматической) мембраны клеток, - которые взаимодействуют с белками ВМ благодаря образованию связи между своими внеклеточными доменами и соответствующими участками в белках матрикса [8], участвуют в передаче сигналов, включающих и выключающих апоптоз. Более конкретно: интегрины, находясь в комплексе с белками ВМ, передают через клеточную мембрану и с участием внутриклеточных доменов сигнал, запрещающий апоптоз; при разрыве связи с матриксом каким-то образом формируется сигнал, разрешающий апоптоз. Такая зависимость апоптотической гибели клеток от их связи с матриксом (субстратом) получила название аноикиса (транслитерация греческого слова "бездомность") [5].

Сведения о механизмах апоптоза и участия в нем интегринов неоднозначны. Семейство интегринов весьма обширно (около 20 членов), и роль в апоптозе большинства из них не исследована, а информация о тех немногих, которые исследовались, противоречива. Так, линия клеток меланомы, не экспрессирующая интегрин $\alpha_v\beta_3$, (коллаген- и витронектин специфический рецептор), подвергается апоптозу при культивировании в коллагеновом геле, в то время как исходная линия, активно синтезирующая $\alpha_v\beta_3$, оказалась устойчивой к апоптозу [9]. Однако при исследовании линии клеток яичника китайского хомячка, культивируемых на смешанном фибронектин-витронектиновом субстрате, было установлено, что экспрессия $\alpha_v\beta_3$ не предотвращала апоптоз в отсутствие фибронектинового рецептора $\alpha_5\beta_1$, и только линия, экспрессирующая этот рецептор, оказалась жизнестойкой [7].

Другим обстоятельством, затрудняющим понимание механизмов апоптоза и роли матрикс-специфических рецепторов, является то, что хотя все известные типы клеток экспрессируют на своей поверхности те или иные интегрин, далеко не все клеточные типы подвергаются апоптозу при разрыве связи с матриксом [4,5].

Из изложенного следует, что для исследования указанных механизмов важен такой подбор сравниваемых клеточных линий, которые были бы максимально близки по происхождению, по возможности мало различались по спектру экспрессируемых ("выставляемых" на клеточную поверхность) интегринов и в то же время существенно различались по апоптозу, т.е. по способности к выживанию вне "дома" - вне связи с субстратом.

В настоящей работе получена популяция карциномных клеток кишечника человека, характеризующаяся высокой выживаемостью в отсутствие связи с субстратом (апоптоз-отрицательная популяция), из исходной апоптоз-положительной линии указанных клеток. Проведен анализ экспрессии широкого набора интегринов указанными клеточными популяциями.

МЕТОДИКА. Исследования проведены на клеточной линии Сасо-2 (любезно предоставлена д-ром М.А.Никифоровым, Иллинойский университет в Чикаго), полученной из карциномы кишечника человека. Клеточную культуру поддерживали в среде F-12 и DMEM (1:1) в присутствии 16% сыворотки эмбрионов коров. Кроличьи антитела к цитоплазматическим доменам α -субъединиц интегринов человека (α_1 , α_2 , α_3 , α_5 и α_6) любезно предоставлены д-ром А.В.Любимовым (Всероссийский онкологический научный центр, Москва). Кроличьи антитела к полному димеру - интегину $\alpha_v\beta_3$ человека куплены у фирмы Gibco/BRL. Полигидроксизтилметакрилат (поли-ГЭМА) и N-гидроксисукцинимид-биотинамидапроат (NSH-биотин) приобретен у фирмы Sigma.

Для получения апоптоз-отрицательной популяции исходную линию пассировали в течение 72 часов в среде с сывороткой на пластиковых чашках Петри, покрытых субстратом, препятствующим клеточной адгезии, - поли-ГЭМА - по описанной методике [4]. В этих условиях апоптоз-положительные клетки погибают. Выживаемость клеток определяли микроскопически по «исключению» красителя трипанового синего. Для отделения выживших клеток от погибших клеточную суспензию пассировали в течение 2 часов на чашках Петри, покрытых адгезивным субстратом - коллагеном типа I, выделенным из сухожилий крыс по описанной методике [10]. В этих условиях к субстрату прикрепляются только живые клетки. Прикрепившиеся клетки суспендировали в изотоническом фосфатно-солевом буфере (ФСБ) или в культуральной среде для дальнейшего пассирования. Исходную культуру также пассировали в течение двух часов на коллагеновом субстрате, после чего прикрепившиеся клетки суспендировали в ФСБ.

Для отметки белков плазматической (поверхностной) мембраны биотином суспензию клеток ($6 - 8 \times 10^6$) в ФСБ центрифугировали и к 0.1 мл клеточного осадка добавляли 8 мл среды DMEM и раствор NHS-биотина в диметилсульфоксиде до конечной концентрации 100 мкг/мл. Суспензию инкубировали в течение 30 мин. при комнатной температуре, после чего клетки осаждали, промывали несколько раз культуральной средой и лизировали в буфере, содержащем 0.1 М неионного детергента (октил- β -D глюкопиранозида) по описанной методике [11]. Из клеточного экстракта удаляли мембранные фракции центрифугированием при 15000 g 10 мин. и определяли содержание биотина с использованием авидин-пероксидазы как при иммуноферментном анализе.

Для иммунопреципитации интегринов, которую проводили по описанной процедуре [11], использовали 1 мл экстракта, 25 мкл соответствующих антител и 50 мкл белок А-агарозы.

Адгезию клеток на белках внеклеточного матрикса исследовали как описано нами ранее [12].

Для выделения ДНК $2 - 4 \times 10^6$ клеток лизировали 0,5% Тритоном X-100 в 10 мМ Трис-HCl буфере, pH 7,4, содержащем 10 мМ ЭДТА; нуклеиновые кислоты трижды депротеинизировали фенол-хлороформом, несколько раз переосаждали этанолом и анализировали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Хотя по литературным данным, клетки Сасо-2 является аноикис-положительными [13], это свойство необходимо было проверить для предоставленной нам линии. С этой целью клетки пассировали на не адгезивном электронейтральном субстрате - поли-ГЭМА, препятствующем клеточной адгезии на твердом носителе. Исследование проводили в присутствии и отсутствии факторов роста (эмбриональной сыворотки), которые могут способствовать выживанию клеток. Как видно из таблицы, количество клеток, сохраняющих жизнеспособность на поли-ГЭМА, зависит от длительности пассирования и от присутствия сыворотки. В отсутствие сыворотки подавляющее большинство клеток, лишенных связи с адгезивным субстратом, погибает через 72 часа. Однако и в присутствии факторов роста (16% сыворотки) за этот период погибает большинство (70%) клеток.

Таблица. Выживание клеток Сасо-2 при пассировании на не адгезивном субстрате - поли-ГЭМА (% живых клеток от исходного количества пассированных клеток, $M \pm m$)

Условия пассирования	Длительность пассирования на поли-ГЭМА (часы)		
	5	24	72
	Выживание клеток		
Без сыворотки	$65 \pm 2,4$	$42 \pm 2,5$	$15 \pm 7,0$
16 % сыворотки	$80 \pm 8,7$	$47 \pm 3,2$	$30 \pm 3,0$

Далее необходимо было определить, по какому механизму (апоптотическому или некротическому) осуществляется гибель анализируемой клеточной линии в отсутствие связи клеток с адгезивным субстратом. Одним из наиболее характерных признаков апоптоза является межнуклеосомное расщепление ядерной ДНК, которое приводит к появлению олигонуклеотидных фрагментов, кратных по размеру 200- 230 парам нуклеотидов [14]. При электрофорезе такого препарата ДНК выявляется так называемая "лестница", соседние ступеньки которой разнятся по размеру в 200- 230 нуклеотидных пар.

При электрофоретическом анализе (данные не приведены) оказалось, что ядерная ДНК, выделенная из исходной линии Сасо-2, представлена высокомолекулярными

агрегатами, слабо мигрирующими в агарозный гель. ДНК, выделенная из клеток, лишенных связи с адгезивным субстратом в течение 72 часов, содержит наряду с высокомолекулярными агрегатами, также низкомолекулярные формы, которые распределяются по всему гелю. Следует отметить, что типичная "лестничная" картина обнаруживается при апоптотической гибели лишь некоторых типов клеток (например, клеток крови) [14]. Для эпителиальных клеток более характерна "смазанная" картина (отсутствие четких ступенек - так называемая "smear" [13]), которую мы и обнаружили.

Таким образом, исходная линия действительно является аноикис-положительной.

Отдельные представители семейства интегринов обладают различным сродством к разным белкам матрикса, которые используются в качестве адгезивных субстратов при пассировании клеток [15]. Клетки экспрессируют на своей поверхности, как правило, не один, а несколько (спектр) интегринов, так что адгезия клеточной популяции на отдельном субстрате определяется этим спектром и сродством каждого рецептора к данному субстрату.

Таким образом, исследование клеточной адгезии с использованием различных субстратов дает представление о наборе экспрессируемых клетками интегринов.

Из рис. 1 видно, что исходная линия (аноикис-положительные клетки) и полученная от нее клеточная популяция, сохраняющая жизнеспособность при пассировании на не адгезивном субстрате (аноикис-отрицательные клетки), обладают одинаковым сродством к нативному коллагену. Из указанного рисунка также видно, что аноикис-отрицательные клетки обладают существенно меньшим сродством к фибронектину. Некоторые различия в адгезии двух типов клеток на денатурированном коллагене и ламинине при статистической обработке данных оказались недостоверными ($P > 0,05$)

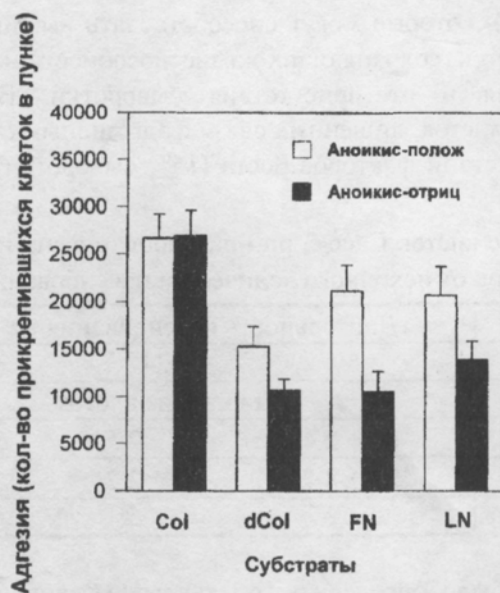


Рисунок 1.

Адгезия аноикис-положительных и аноикис-отрицательных клеток на белках внеклеточного матрикса ($M \pm m$). Col - нативный коллаген; dCol - денатурированный коллаген; FN - фибронектин; LN - ламинин.

Поскольку клетки экспрессируют широкий набор интегринов, и большинство из этих рецепторов обладают перекрывающейся специфичностью по отношению к их субстратам - белкам матрикса (в том числе к фибронектину), - на основании данных по клеточной адгезии

трудно определить, "дефицит" какого интегрина (или интегринов) на клеточной поверхности аноикис-отрицательных клеток определяет их меньшее сродство к фибронектину. Вместе с тем известно, что к числу наиболее распространенных фибронектин-специфических рецепторов относятся интегрин $\alpha_5\beta_1$ и интегрины семейства α_v ($\alpha_v\beta_1$ и $\alpha_v\beta_3$) [8]. Таким образом, можно было предположить, что различия по экспрессии именно этих рецепторов и определяют неодинаковое сродство исследуемых аноикис-положительных и аноикис-отрицательных клеток к фибронектину.

Более прямой ответ на этот вопрос может быть получен при анализе экспрессии отдельных интегринов анализируемыми клетками. С этой целью клетки были помечены биотином в условиях, когда метка включается только в белки поверхностной мембраны, а затем меченые интегрины осаждались соответствующими антителами. Иммунопреципитаты анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, который проявляли с помощью так называемого "иммуноблотинга". Поскольку молекула любого интегрин является димером, состоящим из нековалентно связанных α - и β -субъединиц, преципитация антителами к любой из субъединиц приводит к осаждению всего димера, и на электрофореграмме обнаруживаются обе субъединицы. Кроме того, большинство из субсемейств интегринов характеризуется общей для каждого из членов данного субсемейства β -субъединицей, которая образует димер с уникальной α -субъединицей, так что количественной мерой экспрессии данного рецептора является экспрессия α -субъединицы.

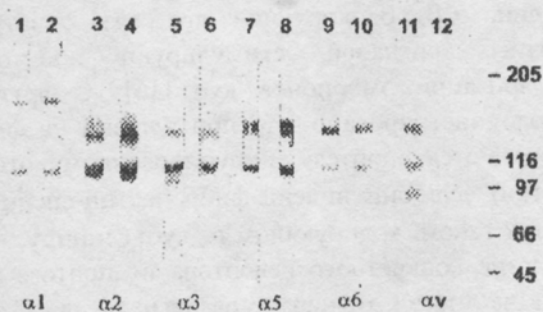


Рисунок 2.

Экспрессия интегринов на поверхности аноикис-положительных и аноикис-отрицательных клеток. Представлены данные электрофореза в ПААГ иммунопреципитатов биотинилированных белков из плазматической мембраны аноикис-положительных (треки 1,3,5,7,9,11) и аноикис-отрицательных (треки 2,4,6,8,10,12) клеток. Треки 1,2 -преципитация антителами к α_1 ; 3,4 - антителами к α_2 ; 5,6 - антителами к α_3 ; 7,8 - антителами к α_5 ; 9,10 - антителами к α_6 ; 11,12 - антителами к α_v . Цифры справа - мол. массы маркеров (кДа)

Из рис.2 видно, что оба типа клеток экспрессируют широкий набор интегринов, который в основном представлен рецепторами, обладающими общей β_1 -субъединицей (субсемейство β_1 или VLA). Кроме того, обнаружена экспрессия двух интегринов с общей α_v -субъединицей, но с различными β -субъединицами: $\alpha_v\beta_1$ (β -субъединица с молекулярной массой 116 кДа) и $\alpha_v\beta_3$ (β -субъединица с молекулярной массой 97 кДа). Из рисунка также видно, что отдельные интегрины различаются между собой по степени экспрессии на обоих типах клеток. Так, экспрессия рецепторов $\alpha_5\beta_1$ и $\alpha_6\beta_1$ выше по сравнению с

интегринами $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_3\beta_1$ как в случае исходной линии, так и в популяции аноикис-отрицательных клеток.

Более интересный вывод, вытекающий из данных рис.2, касается различий в экспрессии интегринов между аноикис-положительными и аноикис-отрицательными клетками. Видно, что по экспрессии большинства рецепторов субсемейства β_1 указанные клетки между собой не различаются. Вместе с тем сравниваемые клеточные типы весьма существенно различаются по экспрессии α_v -содержащих интегринов. Сравнение треков 11 и 12 на рис. 2 показывает, что аноикис-отрицательные клетки значительно менее активны в экспрессии димеров $\alpha_v\beta_1$ и $\alpha_v\beta_3$. Известно, что оба эти рецептора являются фибронектин-специфическими интегринами. Этим обстоятельством и можно объяснить меньшую адгезию на фибронектиновом субстрате аноикис-отрицательных клеток.

Итак, основной вывод, вытекающий из проведенных исследований, состоит в том, что индуцирование в клетках субстратной независимости апоптоза (по крайней мере, на моделях двух клеточных популяций) приводит к резкому снижению поверхностной экспрессии интегринов группы α_v .

Участие α_v -интегринов в передаче внутриклеточных сигналов, контролирующих апоптотическую гибель клеток, исследовалось в ряде работ. Так, показано, что линия меланомных клеток человека, характеризующаяся отсутствием синтеза α_v -субъединицы, подвергается апоптозу при пассировании клеток в трехмерном коллагеновом геле, в то время как восстановление синтеза этой субъединицы с помощью трансфекции соответствующего гена, предотвращает апоптоз [9]. С этим результатом согласуются исследования, показавшие, что антагонисты интегрин $\alpha_v\beta_3$, блокирующие его связь с матриксом и, соответственно, передачу внутриклеточных сигналов, стимулируют апоптоз ангиогенных клеток, участвующих в васкуляризации эмбрионов кур [16]. С другой стороны, на клетках китайского хомячка продемонстрировано, что при адгезии на фибронектиновом субстрате указанные клетки подвергаются апоптозу, индуцированному отсутствием факторов роста (эмбриональной сыворотки), если они лишены фибронектин-специфического интегрин $\alpha_5\beta_1$. Трансфекция таких клеток геном, кодирующим α_v -субъединицу, не спасало их от апоптоза [7]. Таким образом, участие конкретного рецептора в апоптозе зависит от типа клеток и условий эксперимента, в частности, от характера сигнала или его модификации (в данном случае отсутствие факторов роста), запускающего апоптоз.

Общим в цитированных работах является то, что клетки подвергались апоптозу при блокировании экспрессии того или иного интегрин. Очевидно, эта особенность противоречит результатам, полученным в настоящем исследовании, показавшем, что клетки, резистентные к апоптозу, продуцируют, против ожидания, не больше, а меньше α_v -содержащих интегринов. Это означает, по крайней мере в первом приближении, что в случае разрыва связи клетки с матриксом экспрессируемые на ее поверхности интегрины группы α_v могут генерировать сигнал, "включающий" апоптоз.

В настоящее время проводятся исследования, направленные на проверку этого предположения. Однако независимо от результатов, которые удастся получить, предложенный способ получения близких по происхождению, но различающихся по субстратной зависимости апоптоза клеточных популяций представляет удобную модель для изучения механизмов апоптотической гибели клеток и роли интегринов в этом процессе.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (проект 96-04-50543)

ЛИТЕРАТУРА

1. Reed J.C. (1994). J. Cell Biol.- **124**, 1-6
2. Уманский С.Р. (1996). Молекулярная биология, **30**, 487-502
3. Schulze-Osthoff K. (1994). Trends in Cell Biol.- **4**, 421-426
4. Frisch S.M., Francis H. (1994). J. Cell Biol.- **124**, 619-626
5. Ruoslahti E., Reed J.C. (1994). Cell. - **77**.- P. 477-478
6. Bodreau N., Sympon C.J., Werb Z., Bissel M.J. (1995). Science. **267**, 891-893
7. Zhang Z., Vuori K., Reed J.C., Ruoslahti E. (1995). Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- **92**.- 6161-6165
8. Hynes O.R. (1992) Cell.- **69**.- 11-25
9. Montgomery A.M., Reisfeld R.A., Cheres D.A. (1994). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**.- 8856-8860.
10. Miller E.J., Rhodes R.K. (1982). Meth. Enzymol.- **82** (Part A).- 33-64
11. Davis E.G. (1992).- Biochem. Biophys. Res. Commun. **182**.- 1025-1031.
12. Berman A., Morozovich G., Karmansky I., Gleiberman A., Bychkova V. (1993). Biochem. Biophys. Res. Commun.- **194**.- 351-357
13. Meridit J.E., Fazeli B., Schwartz A. (1993). Mol. Biol. Cell.- **4**.- 953-961
14. Wyllie A. (1980). Nature.- **284**.- 555-556
15. Hynes O.R. (1992). Cell.- **69**.- 11-2
16. Brooks P.C., Montgomery A.M.P., Rosenfeld M., Reisfeld R.A., Hu T., Klier G., Cheres D.A. (1994). Cell.- **79**.- 1157-1164

EXPRESSION OF INTEGRINS IN HUMAN GUT CARCINOMA CELLS, DIFFERING IN ANCHORAGE DEPENDENT APOPTOSIS.

G.E.MOROZEVICH, N.I.KOZLOVA, A.E.BERMAN

Institute of Biomedical Chemistry, RAMS, Moscow

A cell population, characterized by a capacity to survive in the absence of cell attachment to a substrate (anoikis-independent cells), was selected from the original anoikis-dependent human gut carcinoma line Caco-2. In cell-adhesion assays, anoikis-independent cells demonstrated much lower affinity to fibronectin compared to their anoikis-dependent counterparts. No differences were found between the cell types in their surface expression of integrins $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, and $\alpha_6\beta_1$, while integrins $\alpha_v\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ appeared to be much more actively expressed by the anoikis-dependent population. The procedure we have proposed for obtaining of cell populations having closely similar origination, while differing in anchorage-dependent apoptosis, provides a suitable model for investigation of apoptotic and the role of integrins in its mechanism.

Key words: integrins, apoptosis, substrate dependence, anoikis, cell adhesion