

СЕРИЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.27:577.112.7

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ УФ-СВЕТА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С3 КОМПОНЕНТА КОМПЛЕМЕНТА С ЕГО РЕЦЕПТОРАМИ НА ПОВЕРХНОСТИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

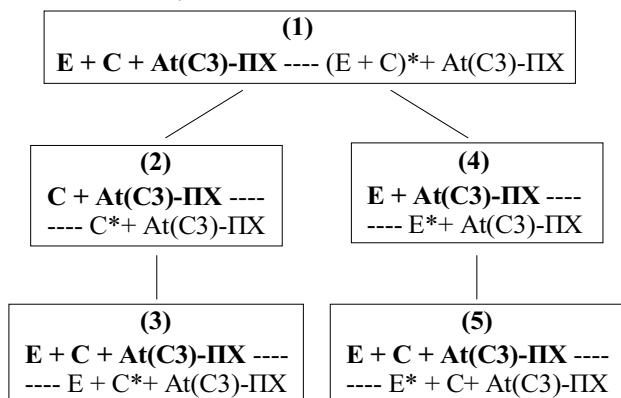
© 2000 г. В.Г. Артюхов, В.В. Гусинская, О.М. Дурова

Воронежский государственный университет

С помощью специально разработанных тестов ELISA исследовано влияние УФ-света (75,5 755 и 2265 Дж/м²) на структурно-функциональное состояние свободного (сывороточного) и мембраносвязанного С3 компонента, а также его рецепторов на мембранах эритроцитов человека. Выявлен эффект фотоактивации системы из взаимодействующих эритроцитарных мембран и сыворотки крови доноров, проявляющийся в повышении способности свободного и мембраносвязанного С3 взаимодействовать со специфическими антителами. Показано, что этот эффект является суммарным и определяется при малой дозе УФО (75,5 Дж/м²) фотоактивацией сывороточного С3 с образованием, в частности, С3в-фрагментов (субкомпонентов), при более высоких дозах (до 2265 Дж/м²) – повышением экспрессии рецепторов к С3 в результате “кеппинг” - эффекта на мембранах эритроцитов.

Данная работа является продолжением проводимых на кафедре биофизики и биотехнологии исследований по изучению фотомодификаций белков системы комплемента сыворотки крови человека [1]. Так как практически все биологические функции комплемента обусловлены его взаимодействием с клеточными мембранами, то для получения более полной информации о фотомодификациях в этой системе представлялось целесообразным изучить влияние УФ-света на взаимодействие её ключевого компонента — фактора С3 с его рецепторами (в частности, CR1) на поверхности мембран эритроцитов.

Эксперименты на основе разработанных нами тестов неконкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием моноклональных антител против С3 и его С3b-субфрагментов проводили по следующей схеме:



1. Влияние УФ-света на функциональное состояние белка С3 в системе взаимодействующих с мембранами эритроцитов факторов комплемента

В первой серии экспериментов (см.схему (1)) было изучено влияние различных доз УФ-света (75,5; 755; 2265 Дж/м²) на антителосвязывающую способность С3 фактора комплемента и его субфрагментов в системе взаимодействующих компонентов — мембран эритроцитов и сыворотки крови доноров ((E + C)* + At(C3)-ПХ). Под антителосвязывающей способностью мы подразумевали способность адсорбированных на мембранах эритроцитов еще в условиях *in vivo* и связанных с ними после соединения компонентов в ИФА-системе молекул белка С3 и его С3b-субфрагментов акцептировать специфические к ним антитела. При этом на поверхность 96-луночных полистироловых планшет последовательно наносились взвесь нативных или УФ-облученных эритроцитов крови доноров (1,5·10⁸ клеток/мл); 1%-ный бычий сывороточный альбумин; нативная или УФ-облученная сыворотка (в разведении 1:16 с буфером PBS, pH 7,4) крови тех же доноров в качестве источника белка С3, выступающего в роли антигена; моноклональные антитела к С3 (3,3

Жирный шрифт — контрольная система, нормальный шрифт — опытная система; E — иммобилизованные на носителе эритроциты крови доноров; C — сыворотка крови доноров (источник С3); At(C3)-ПХ — конъюгат пероксидазы хрена с антителами к С3 и его субфрагментам; * — УФ-облученный компонент ИФА-системы

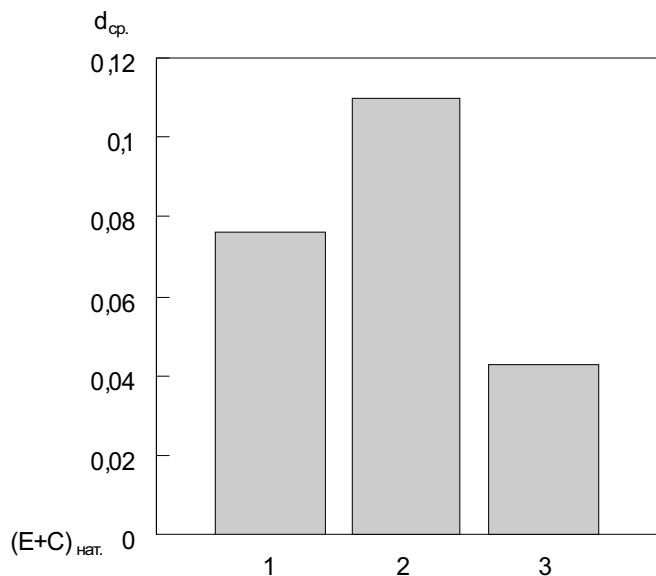


Рис. 1. Изменения антителосвязывающей способности свободного и мембраносвязанного СЗ в ИФА-системе (Е + С)* + At(СЗ)-ПХ. Контроль (0) – D₄₉₂ нативной ИФА-системы (Е + С)_{нат.} Здесь и на рис. 2-5: 1 – УФО в дозе 75,5 Дж/м², 2 – 755 Дж/м², 3 – 2265 Дж/м², d_{ср.} – средняя разность между значениями D₄₉₂ опытных и контрольных образцов, ед.оптич. плотности.

мкг/мл), конъюгированные с ферментной меткой (пероксидазой хрена - ПХ) и субстратная смесь, включающая H₂O₂ и хромоген - ортофенилендиамин (ОФД). Используемые антитела обладали специфичностью не только к СЗ, но, даже в большей степени, и к его СЗб-субфрагменту. После каждой стадии проводили инкубацию системы в течение 1 часа и отмывку несвязавшихся компонентов. После иммобилизации на носителе взвеси эритроцитов производили освобождение их от внутреннего содержимого путем гипоосмотического лизиса дистиллированной водой.

Полученные данные (рис.1) свидетельствуют о том, что после УФО в дозах 75,5; 755 и 2265 Дж/м² эритроцитов и сыворотки крови доноров с последующим внесением их в ИФА-систему регистрируется статистически достоверное (0,001 < P < 0,01) увеличение оптической плотности детектируемого продукта реакции по отношению к системе, где все рассматриваемые компоненты являются необлученными.

Для объяснения наблюдаемого эффекта повышения антителосвязывающей способности СЗ в ИФА-системе (Е + С)* + At(СЗ)-ПХ) были выдвинуты следующие предположения:

1) под действием УФ-света происходит увеличение числа мембраносвязанных компонентов СЗ и СЗб за счет повышения активности сывороточного СЗ;

2) увеличение числа адсорбируемых на мембране антител к СЗ после УФО может происходить за счет структурных перестроек самих мембран, к примеру, транслокации рецепторов со связанными фрагментами СЗ компонента, а также демаскирования ранее скрытых свободных рецепторов к СЗ, с которыми впоследствии может связаться дополнительное количество лигандов;

3) повышение ИФА-сигнала после УФО компонентов системы может быть следствием неспецифического связывания антител с эритроцитами.

В связи с этим были проведены эксперименты по анализу фотомодификаций сывороточного СЗ (см. схему (2,3) и эритроцитных мембран (см. схему (4,5) и определению их вклада в общее УФ-индуцированное изменение антителосвязывающей способности всей системы.

2. Влияние УФ-света на функциональное состояние сывороточного СЗ

Для изучения антителосвязывающей способности сывороточного СЗ на поверхность полистироловых планшет наносилась нативная и УФ-облученная в дозах 75,5; 755 и 2265 Дж/м² сыворотка, являющаяся источником СЗ компонента, а затем конъюгат At(СЗ)-ПХ (см. схему (2)).

Как видно на рис.2, воздействие УФ-света на сы-

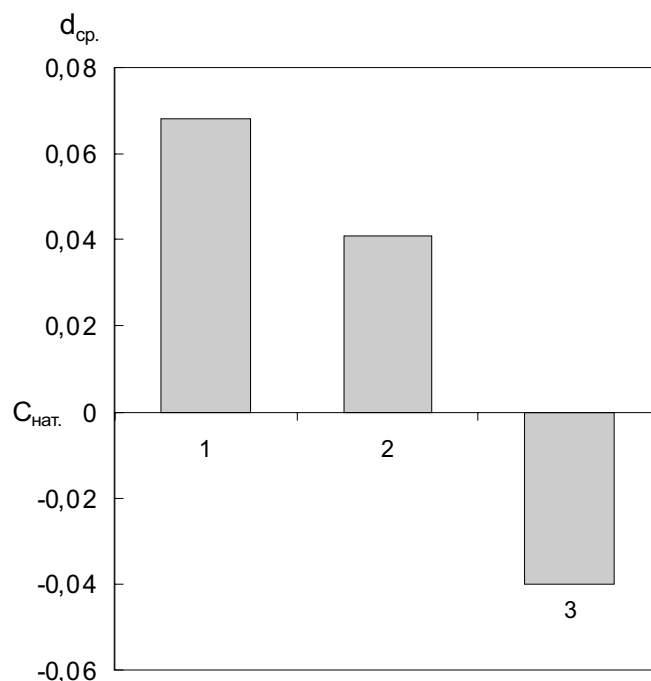


Рис. 2. УФ-индуцированные изменения антителосвязывающей способности свободного СЗ в ИФА-системе С* + At(СЗ)-ПХ. Контроль (0) – D₄₉₂ ИФА-системы с нативной сывороткой С_{нат.}

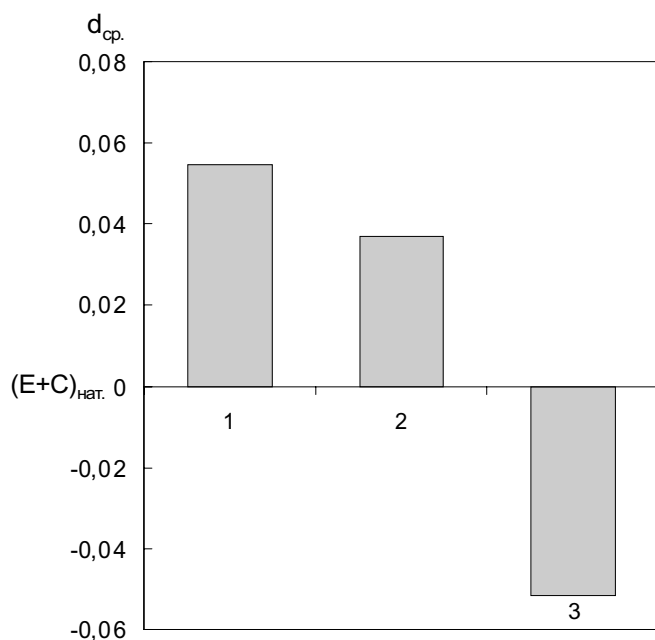


Рис. 3. УФ-индуцированные изменения способности сывороточного С3 взаимодействовать с мембранами эритроцитов в ИФА-системе E + C* + At(C3)-PIX. Контроль (0) – D₄₉₂ нативной ИФА-системы (E + C)_{нат.}

воротку крови доноров в минимальной дозе индуцирует резкое увеличение по сравнению с нативным контролем оптической плотности детектируемого продукта реакции. Доза 755 Дж/м² менее значительно, но статистически достоверно (0,001 < P < 0,01), повышает величину D₄₉₂, а максимальная доза вызывает снижение ИФА-сигнала по сравнению с контролем.

Увеличение способности С3 из УФ-облученной в дозах 75,5 и 755 Дж/м² сыворотки связывать специфические антитела является, по всей видимости, следствием повышения функциональной активности С3 в результате его расщепления на субфрагменты С3а и С3b. Последний, как было отмечено, обладает более высоким сродством к антителам, чем сам С3.

Снижение ИФА-сигнала ниже контрольного значения, а значит, и количества связавшихся с С3 антител, после УФ-облучения сыворотки в дозе 2265 Дж/м² может быть следствием УФ-инактивации сывороточного С3. Но так как описанные в работе [2] данные об изменении гемолитической активности УФ-облученного и внесенного в нативную сыворотку белка С3 свидетельствуют о его фотоактивации в исследуемом диапазоне доз УФ-света, то падение антителосвязывающей способности С3 в УФ-облученной максимальной дозой сыворотке, возможно, связано с фотоактивацией сывороточных ингибиторных протеиназ (фак-

торов Н и I), ослабляющих процесс расщепления С3 на активные по отношению к антителам и мембранам субфрагменты.

С целью определения способности УФ-модифицированного С3-фактора взаимодействовать с рецепторами на поверхности мембран эритроцитов была проведена серия экспериментов с сохранением всех компонентов исходной системы (см. схему (3)), но при этом УФ-облучалась только сыворотка крови доноров. В этой системе (E + C* + At(C3)-PIX), где компонент С3 взаимодействует с С3-рецепторами на мембране иммобилизованных эритроцитов, после УФ-облучения сыворотки крови (75,5, 755 и 2265 Дж/м²) зарегистрированы статистически достоверные (P < 0,01) изменения ИФА-сигналов (рис.3), аналогичные таковым для системы C* + At(C3)-PIX (см. рис.2). Сходство ответных реакций С3 компонента в указанных системах свидетельствует о том, что в основе их фотомодификаций лежат и сходные механизмы, касающиеся самого фактора С3 и процессов его расщепления на субфрагменты.

Таким образом, малые дозы УФ-света индуцируют активацию С3 компонента комплемента, облегчая процесс его расщепления на субфрагменты, в том числе на С3b. С ростом дозы УФ-облучения фотомодификации приобретают обратную направленность: происходит нарушение процесса расщепления С3 на С3а и С3b, вероятно, за счет фотоактивации соответствующих сывороточных ингибиторов (к примеру, факторов I и H).

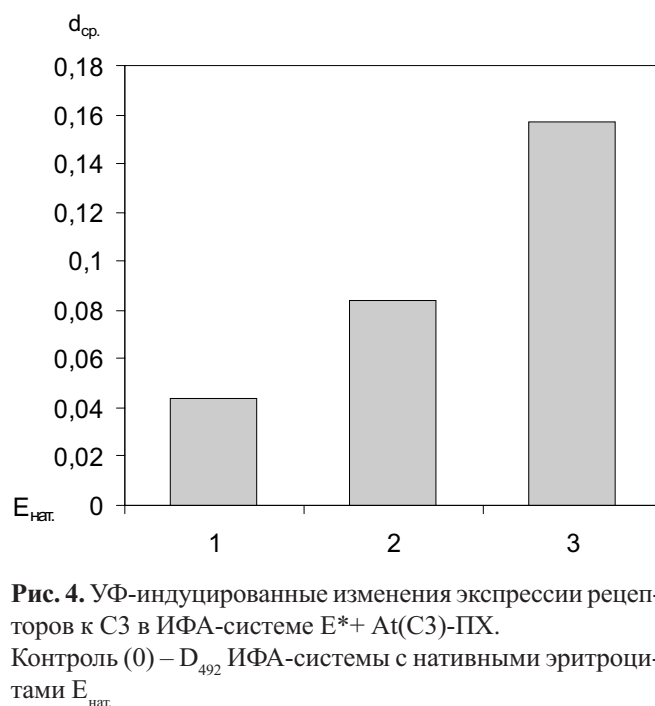


Рис. 4. УФ-индуцированные изменения экспрессии рецепторов к С3 в ИФА-системе E* + At(C3)-PIX. Контроль (0) – D₄₉₂ ИФА-системы с нативными эритроцитами E_{нат.}

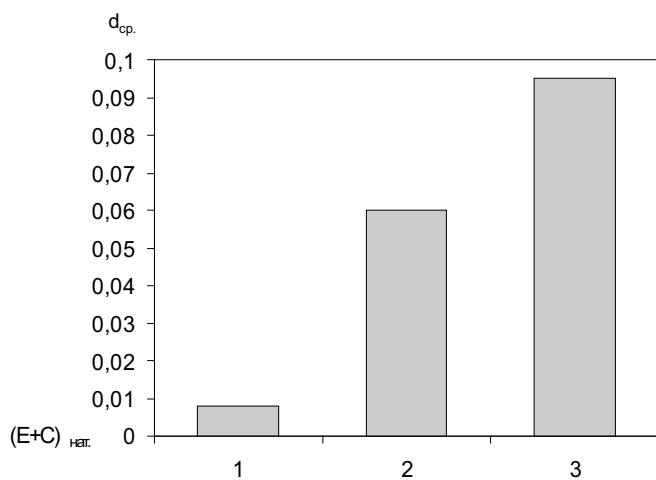


Рис. 5. УФ-индуцированные изменения антителосвязывающей способности мембраносвязанного СЗ в ИФА-системе $E^* + C + At(C3)$ -ПХ. Контроль (0) – D_{492} нативной ИФА-системы $(E + C)_{нат.}$

3. Влияние УФ-света на функциональное состояние мембраносвязанного СЗ и экспрессию его рецепторов

О структурных фотомодификациях мембран эритроцитов человека судили по изменению антителосвязывающей способности мембраносвязанного СЗ в ИФА-системе $E^* + At(C3)$ -ПХ (см. схему (4)). Под мембраносвязанным СЗ мы понимаем связавшиеся с рецепторами CR1 в условиях *in vivo* его СЗb-фрагменты, так как последние обладают в 1000 раз большей аффинностью к CR1, чем сам СЗ [3]. При этом на микропланшеты проводили иммобилизацию нативных и УФ-облученных в дозах 75,5; 755 и 2265 Дж/м² эритроцитов крови доноров ($1,5 \cdot 10^8$ клеток/мл), а затем — адсорбцию на них конъюгата.

Рост дозы УФО в указанном диапазоне индуцирует увеличение D_{492} исследуемой ИФА-системы (рис.4), что является следствием возрастания числа сорбированных на УФ-облученных эритроцитарных мембранах антител к СЗ. Это может быть обусловлено такого рода структурными фотомодификациями мембран эритроцитов, которые приводят к антигенному дрейфу, изменяя общую картину набора и локализации антигенных детерминант и рецепторов на поверхности клетки. Одним из результатов подобных перестроек является «кеппинг»-эффект, проявляющийся в формировании рецепторных кластеров и в усилении антителосвязывающей способности.

Аналогичными ответными реакциями (рис.5) на воздействие УФ-света в указанных дозах характеризуется и система $E^* + C + At(C3)$ -ПХ (см. схему (5)), где на иммобилизованные нативные и УФ-облученные эритроциты сорбировались компоненты натив-

ной сыворотки. Эта серия экспериментов проводилась с целью выявления способности УФ-модифицированных мембран эритроцитов сорбировать на своей поверхности дополнительные количества СЗ-фрагментов.

При сравнении величин D_{492} нативных систем $E + At(C3)$ -ПХ и $E + C + At(C3)$ -ПХ (табл.) выявляется факт возрастания уровня ИФА-сигнала при внесении в систему сыворотки, что свидетельствует о способности мембран нативных эритроцитов к дополнительной адсорбции СЗ. Но при этом после воздействия УФ-света на эритроцитарные мембраны в системе $E^* + C + At(C3)$ -ПХ степень ответных реакций не выше, а несколько ниже таковых для системы $E^* + At(C3)$ -ПХ (сравнить рис.4 и 5), что исключает эффект демаскирования ранее скрытых рецепторов на поверхности УФ-облученных эритроцитов. Следовательно, усиливающееся с ростом дозы УФО повышение антителосвязывающей способности эритроцитов в этих системах можно объяснить «кеппинг»-эффектом рецепторов со связанными фрагментами СЗ.

Таблица Величины оптической плотности (D_{492}) контрольных ИФА-систем

ИФА-система	D_{492}
$E + C + At(C3)$ -ПХ	$0,432 \pm 0,001$
$E + At(C3)$ -ПХ	$0,329 \pm 0,004$
$C + At(C3)$ -ПХ	$0,302 \pm 0,005$

Возвращаясь к системе в целом $(E + C)^* + At(C3)$ -ПХ и основываясь на том, что общий эффект её УФ-активации (см. рис.1) обусловлен фотомодификациями свободного (сывороточного) СЗ и передислокацией его рецепторов с мембраносвязанными СЗb-субфрагментами, в сумме составляющих 100%, из данных, представленных на рис.3 и 5, был определен вклад каждой из составляющих системы при различных дозах УФО.

На основании полученных данных сделан вывод о том, что обнаруженный эффект фотоактивации всей системы $(E + C)^* + At(C3)$ -ПХ, проявляющийся в повышении её способности связывать антитела к СЗ, является суммарным и определяется при малой дозе УФО (75,5 Дж/м²) примерно на 80% фотоактивацией сывороточного СЗ с образованием, в частности, СЗb-фрагментов, а при более высоких дозах (755 и 2265 Дж/м²) — примерно на 60-70% повышением экспрессии рецепторов СЗ в результате их «кеппинг»-эффекта на мембранах УФ-модифицированных эритроцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусинская В.В. Анализ УФ-индуцированных структурно-функциональных изменений белков системы комплемента и эритроцитарных мембран: Дисс. ... канд.-биол.наук.- Воронеж. 1995. 173 с.
2. Артюхов В.Г., Гусинская В.В. //Вестн. Воронежского ун-та. Сер.2: Естественные науки. 1998. №3. С. 4-18.
3. Berger M., Gaither T.A., Hammer C.H., Frank M.M. // J. Immunol. 1981. V.127. P. 1329-1334.