

УДК 577.112.6.085.23:577.112.6.088.6

# СВЯЗЫВАНИЕ ТАФТСТИНА С ПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ МОЗГА КРЫСЫ, КЛЕТКАМИ ГЛИОМЫ КРЫСЫ И НЕЙРОБЛАСТОМЫ МЫШИ

АРЕФЬЕВА И. А., АЛФЕЕВА Л. Ю., ГРИВЕННИКОВ И. А.

Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва

Обнаружено специфическое взаимодействие тафтсина с плазматическими мембранами мозга крысы и клетками нейробластомы мыши (NB41A3, Neuro 2A) и глиомы крысы (C-6, НГУК-1). Показано, что связывание зависит от времени, обратимо, термолабильно и ингибируется при обработке клеток раствором трипсина. Оптимальные условия для проведения экспериментов на мембранах включают наличие в инкубационной среде 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Величины  $K_d$  для  $[^3\text{H}]$ тафтсина на мембранах мозга и клетках нейробластомы (Neuro 2A) составляют около 10 мкМ и 2 мкМ соответственно. Классические нейротрансмиттеры и опийный антагонист налоксон в концентрации до 50 мкМ не оказывают влияния на взаимодействие тафтсина с клетками нервной системы.

Тафтсин (Thr-Lys-Pro-Arg), представляющий собой фрагмент тяжелой цепи иммуноглобулина G (аминокислотные остатки 289—292), широко известен как эндогенный иммуностимулятор [1]. Рецепторы для этого пептида были выявлены и охарактеризованы на макрофагах мыши [2], а также на моноцитах и полиморфноядерных лейкоцитах периферической крови человека [3]. Сравнительно недавно было обнаружено стимулирующее действие тафтсина и некоторых его аналогов на ЦНС млекопитающих [4, 5], а также на активность ключевого фермента обмена катехоламинов—тирозингидроксилазы [6].

Целью настоящей работы явился поиск центров связывания тафтсина на плазматических мембранах мозга крысы и трансформированных линиях клеток нейронального и глиального происхождения.

## Материалы и методы

В работе использованы трис („Merck“, ФРГ), сахароза, DDC-Na и ЭДТА („Serva“, ФРГ), полиэтиленгликоль („Fluka“, Швейцария), бензамидин, фенилметилсульфонилфторид и БСА („Sigma“, США), все реактивы для работы с клетками, а также культуральная пластиковая посуда фирмы «Flow» (Англия).

Клетки линий C-6, NB-41A3 и Neuro-2a получены от фирмы «Flow», линия НГУК-1 была любезно предоставлена А. С. Холашским (Институт морфологии животных АМН СССР).

Тафтсин синтезирован нами ступенчатым наращиванием полипептидной цепи методом активированных эфиров. Введение тритиевой метки осуществлено в лаборатории изотопного обмена Д. А. Зайцевым. Величина У. А. полученных препаратов составляла 50—60 Ки/ммоль, их гомогенность и идентичность немеченому пептиду подтверждена ВЭЖХ.

Мембраны мозга, сердца, печени и почек крысы, а также клеток линий *C-6*, *НГУК-1* и *Neuro-2A* получали по методу Grau, Whitaker [7] с небольшими модификациями. В частности, для получения мембран мозга использовали следующую схему: беспородных белых крыс (180—200 г) декапировали, извлеченный мозг промывали холодным физиологическим раствором и гомогенизировали в 10 объемах холодной 0,32 М сахарозы, содержащей 1 мМ ЭДТА, 1 мМ бензамидина и 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторида (буфер А). Все последующие операции проводили при 4°. Гомогенат центрифугировали при 1000 г в течение 20 мин, осадок отбрасывали, а супернатант, профильтрованный через 4 слоя марли, подвергали повторному центрифугированию при 40000 г в течение 30 мин. Полученный осадок дважды промывали буфером А, суспендировали в 10 мМ трис-НСl, рН 7,4, содержащем 0,22 М сахарозы и 1 мг/мл БСА и хранили в жидком азоте. Концентрация белка для хранения составляла 15—30 мг/мл (определена по модифицированному методу Лоури [8]). Мембраны сердца, печени и почек крысы, а также клеток линий *C-6*, *NB-41A3* и *Neuro-2A* получали аналогично.

Связывание проводили в 3,5-мл литровых полистирольных пробирках для РИА. Реакционная смесь общим объемом 1 мл содержала 1 мКи [<sup>3</sup>H]тафтсина, соответствующее количество немеченого пептида и 2 мМ CaCl<sub>2</sub> в 50 мМ трис-НСl, рН 7,4. Реакцию начинали добавлением 500 мкг мембран в 200 мкл буфера. Пробирки переносили в шейкер-инкубатор и выдерживали 40—60 мин при температуре 30° и постоянном интенсивном перемешивании. По окончании инкубации пробы фильтровали через стекловолоконные фильтры («Whatman», GF/B), вымоченные в 0,3%-ном растворе полиэтиленмина в течение 2 ч и промытые 3 мл ледяного 50 мМ трис-НСl, рН 7,4. Этим же буфером трижды промывали каждую пробирку и 1 раз фильтр. Фильтры сушили на воздухе и считали в 5 мл толуольного сцинтиллятора (4 г PPO, 0,2 г POROP) с эффективностью 30% на счетчике «Mark-2» («Nuclear Chicago», США). Неспецифическое связывание определяли в присутствии 10<sup>-4</sup> М немеченого тафтсина. Контрольные пробирки содержали те же компоненты, что и в опыте, но не подвергались инкубации, а фильтровались сразу же после добавления белка.

Клетки линий *C-6*, *NB-41A3*, *Neuro-2A* и *Vero*, культивируемые в пластиковых культуральных флаконах на среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки, 2 мМ глутамин и 0,16 мг/мл гентамицина, при 37° и концентрации CO<sub>2</sub> 5%, снимали раствором Версена и сеяли в 96-луночные культуральные микропласты по 50—100 тыс. в 100 мкл

ростовой среды. На следующий день клетки дважды промывали 100 мкл раствора Хенкса и добавляли 100 мкл инкубационной смеси, содержащей 0,3 мкКи  $[^3\text{H}]$ тафтсина и соответствующее количество немеченого пептида. По окончании инкубации (37°, 30 мин), смесь отбирали, а слой клеток трижды промывали 200 мкл раствора Хенкса, растворяли в 120 мкл 0,1%-ного ДДС-Na и 100 мкл полученного раствора считали в 5 мл диоксанового сцинтиллятора ЖС-8 с эффективностью 30% на счетчике «Rackbeta» (LKB, Швеция).

Клетки линий C-6, NB-41A3 и Neuro-2A, культивируемые как указано выше, снимали раствором Версена, центрифугировали и рассевали в круглодонные 96-луночные платы по 100 тыс. клеток в 50 мкл раствора Хенкса, добавляли 50 мкл раствора, содержащего смесь 0,3 мкКи меченого и соответствующее количество немеченого тафтсина и инкубировали 30 мин при 37°. По окончании инкубации клетки собирали полуавтоматическим харвестером («Scatron», Англия) на стекловолоконные фильтры («Whatman», GF/C Англия) с промывкой фосфатно-солевым буфером (10 mM фосфата натрия, 150 mM NaCl, pH 7,4). Фильтры считали в 5 мл диоксанового сцинтиллятора с эффективностью 30%.

## Результаты исследования

### 1. Связывание тафтсина с мембранами различных органов крысы.

Для доказательства специфичности взаимодействия тафтсина с клетками НС, было изучено связывание меченого препарата с мембранами мозга, сердца, почек и печени крысы (рис. 1). Оказалось, что количество пептида, специфически связавшегося с мембранами сердца, почек и печени за 60 мин инкубации при 30°, составляет соответственно 14, 6 и 16% от количества пептида, связавшегося с нервной тканью.

Мембраны мозга были подвергнуты дальнейшей очистке в ступенчатом градиенте сахарозы (0,32, 0,8, 1,2 М, 21000 об/мин 2 ч на роторе SW-25, L5-50, «Beckman», Австрия) [7]. При этом получены три фракции, первая из которых, находящаяся на границе 0,32 и 0,8 М сахарозы, обогащена миелином, вторая (0,8—1,2 М)—синаптосомными мембранами, третья (осадок на дне пробирки)—митохондриями. Связывание  $[^3\text{H}]$ тафтсина с этими фракциями за 60 мин представлено на рис. 2, из которого видно, что фракция, обогащенная синаптосомными мембранами, связывает тафтсин в 2,5 раза более эффективно, чем миелиновая и в 30 раз более эффективно, чем митохондриальная.

На рис. 3 и 4 показана обратимость связывания  $[^3\text{H}]$ тафтсина с мембранами целого мозга при 50-кратном разведении и добавлении избытка немеченого пептида соответственно. Связывание зависит от времени и достигает равновесия через 40 мин при 30°. При добавлении 50-кратного избытка буфера или 1000-кратного избытка неме-

ченого пептида наблюдается быстрая (1—2 мин) диссоциация половины связанной метки с последующим снижением до базового уровня в течение 60 мин. Термическая обработка мембран при 100°

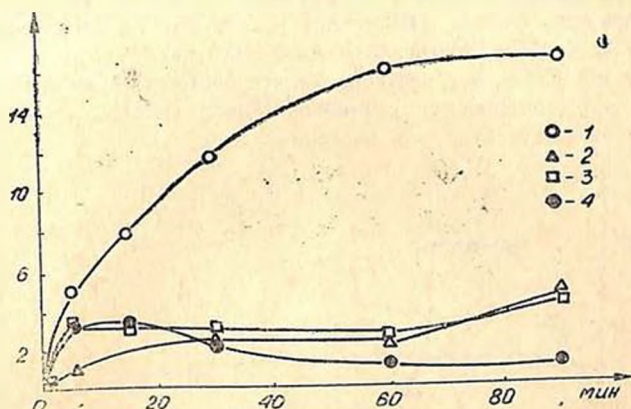


Рис. 1. Связывание тафтсина с мембранами мозга (1), сердца (2), печени (3), и почек (4) крысы при 30°. 1 мл реакционной смеси содержит 1 мкКи (460 пмоль) [<sup>3</sup>H]тафтсина, 500 мкг белка и 2 мМ СаСl<sub>2</sub> в 50 мМ трис-НСl, рН 7,4. Неспецифическое связывание определено в присутствии 100 мкМ немеченого пептида. Данные представляют результат двух экспериментов. Здесь и на рис. 2, 5, 7 по оси ординат — специфическое связывание (имп/мин · 10<sup>-3</sup> М).

в течение 15 мин приводит к полной инактивации участков связывания.

Изучение влияния ионов двухвалентных металлов на связывание тафтсина с мембранами мозга показало, что Mg<sup>2+</sup> (5 мМ) оказывает

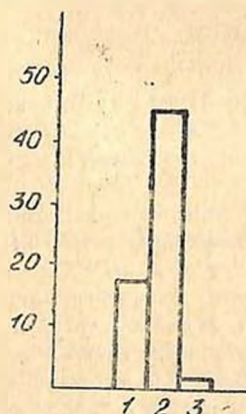


Рис. 2. Связывание тафтсина с препаратами, обогащенными миелином (1), синапсомембранами (2) и митохондриями (3). 1 мл реакционной смеси содержит 4,5 мкКи (500 пмоль) [<sup>3</sup>H]тафтсина, 700 мкг мембран и 2 мМ СаСl<sub>2</sub> в 50 мМ трис-НСl, рН 7,4. Инкубация 1 ч при 30°. Специфическое связывание определено в присутствии 100 мкМ немеченого пептида. Данные представляют средний результат двух измерений.

слабое активирующее воздействие. Наличие в среде инкубации ионов Zn, Со и Мп (1 мМ) приводит к денатурации мембран. Ионы Са увеличивают специфическое связывание тафтсина максимум в 2 раза,

причем его зависимость от концентрации ионов носит колоколообразный характер (рис. 5). Оптимальным является 2 мМ раствор  $\text{CaCl}_2$ . Специфическое связывание  $[^3\text{H}]$ тафтсина с мембранами мозга зависит от природы буфера. Наилучшие результаты (специфическое связывание 35 и 40%) достигаются в 50 мМ трис- $\text{HCl}$ , pH 7,4, содержащем 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ , и в растворе Хенкса соответственно. Применение последнего ограничивается его сравнительно высокой стоимостью и большим расходом буфера в эксперименте.

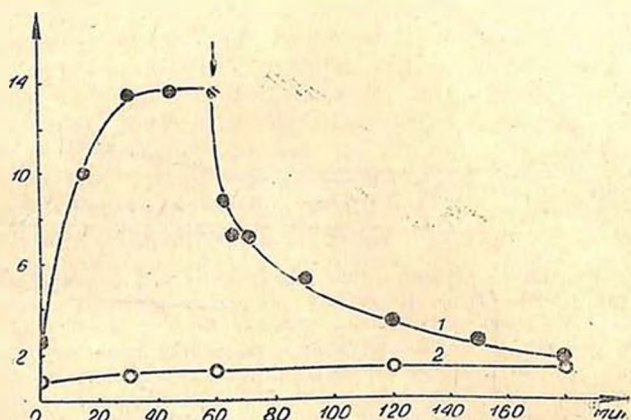


Рис. 3. Диссоциация тафтсина с мембран мозга при разведении (1). Связывание проводили в 0,5 мл раствора Хенкса при 30° в течение 1 ч, затем смесь разбавляли буфером в 50 раз (отмечено стрелкой). Концентрация  $[^3\text{H}]$ тафтсина в исходной смеси 6 мкКи/мл, белка—0,5 мг/мл. Контрольные пробирки содержали 3 мкКи метки и 250 мкг белка в 25 мл раствора Хенкса (2). Данные представляют результат трех экспериментов. Здесь и на рис. 4 по оси ординат—общее связывание (имп/мин · 10<sup>-3</sup> M)

На рис. 6 показана кривая вытеснения  $[^3\text{H}]$ тафтсина с мембран мозга крысы немеченым пептидом. Величины  $K_d$  и максимального связывания, определенные из данной зависимости, составляют около 10 мкМ и 40 пмоль/мг белка соответственно.

## 2. Связывание тафтсина с трансформированными нервными клетками.

$[^3\text{H}]$ тафтсин специфически связывается с прикрепленными и не-прикрепленными клетками глиомы крысы (линии C-6, ИГУК-1) и нейробластомы мыши (линия Neuro-2A). Процент специфического связывания от общего изменяется для различных линий прикрепленных клеток от 30 (C-6) до 70% (Neuro-2A), а для неприкрепленных от 53 (C-6) до 78% (Neuro-2A), причем специфическое связывание полностью исчезает при использовании для снятия клеток с подложки раствора трипсина (0,05% в 0,2% ЭДТА) вместо раствора Версена (инкубация для открепления клеток в обоих случаях длится 10 мин при 37°). В качестве контроля были использованы прикрепленные

трансформированные клетки почечного эпителия зеленой мартышки (линия Vero). Связывание в этом случае отсутствовало.

Мембраны клеток нейрональных и глиальных линий, полученные так же как и мембраны мозга, сохраняют способность связывать [ $^3\text{H}$ ]тафсина с той же эффективностью, что и живые клетки (данные не приведены).

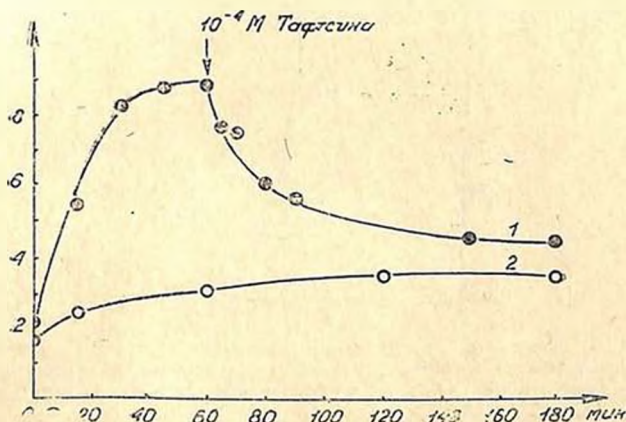


Рис. 4. Диссоциация [ $^3\text{H}$ ]тафсина с мембраны мозга под действием немеченого пептида (1). Связывание проводили в 50 мМ трис- $\text{HCl}$ , pH 7,4 в присутствии 2 мМ  $\text{CaCl}_2$  при 30°. Концентрация тафсина в исходной смеси составляла 1 мкКи/мл (17 нМ), белка—500 мкг/мл. Через 60 мин (указано стрелкой) добавляли 50 мкл раствора немеченого пептида до конечной концентрации 100 мкМ. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 100 мкМ немеченого тафсина (2). Данные представляют результат двух экспериментов

Параметры связывания пептида оценены в эксперименте на прикрепленных клетках линии *Neuro-2A* (рис. 7). Из кривой вытеснения найдено, что  $K_d$  составляет около 2 мкМ, а максимальное связывание—2,3 пмоль на 100 тыс. клеток.

Классические нейротрансмиттеры (норадреналин, дофамин, серотонин и гистамин), а также универсальный опийный антагонист налоксон в концентрациях 50 мкМ не оказывают влияния на взаимодействие тафсина с клетками НС.

### Обсуждение результатов

Предпринятый нами поиск центров связывания тафсина на препаратах нервной ткани млекопитающих обусловлен наличием целого ряда работ, выполненных на физиологическом и поведенческом уровнях, и касающихся действия этого пептида на некоторые функции ЦНС [4—6, 9]. Сравнение эффективности связывания меченого пеп-

тида с мембранами мозга, сердца, печени и почек крысы убедительно демонстрирует предпочтительное взаимодействие тафтенина с препаратом нервной ткани (рис. 1). Аналогичный результат был получен при работе с трансформированными культурами нервных и глиаль-

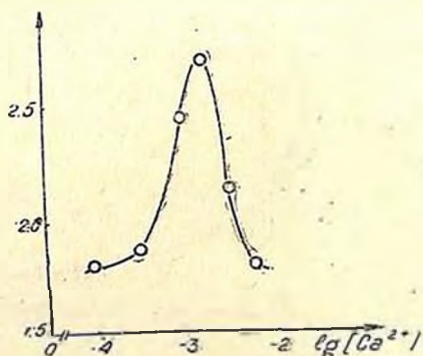


Рис. 5. Зависимость специфического связывания тафтенина с мембранами мозга крысы от концентрации ионов кальция. 1 мл реакционной смеси содержит 1 мкКи (17 пмоль)  $[^3H]$ тафтенина в 50 мМ трис-НСl, pH 7.4. Специфическое связывание определяли в присутствии 100 мкМ немеченого пептида. Данные представляют результат двух экспериментов

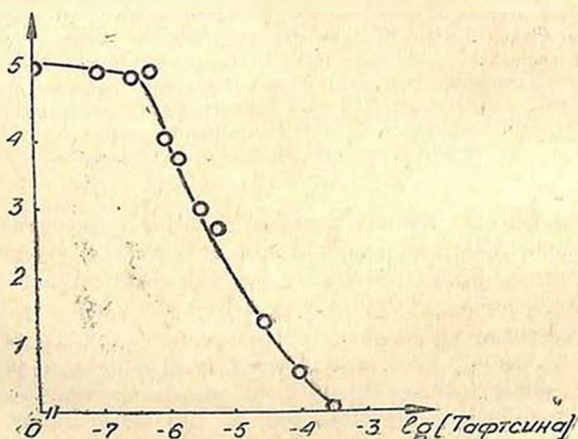


Рис. 6. Вытеснение  $[^3H]$ тафтенина с мембран мозга крысы немеченым пептидом. Реакционная смесь содержит 1 мкКи (17 пмоль)  $[^3H]$ тафтенина, 500 мкг белка и 2 мМ  $CaCl_2$  в 1 мл 50 мМ трис-НСl, pH 7.4. Инкубация 40 мин при 35°. Данные представляют средний результат двух измерений

ных клеток грызунов. Специфическое связывание с этими клетками достигало 80% и полностью отсутствовало в экспериментах на трансформированных клетках почечного эпителия зеленой мартышки (линия Vero).

Для изучения субклеточной локализации центров связывания тафтсина нами были получены фракции сахарозного градиента, обогащенные, согласно данным литературы [7], миелином, синапсомембранами и митохондриями. При этом было обнаружено преимущественное связывание меченого пептида с синапсомембранами (рис. 2). Довольно значительное включение метки в случае миелиновой фракции, вероятно, можно объяснить наличием в ней более легких фрагментов синапсомембран.

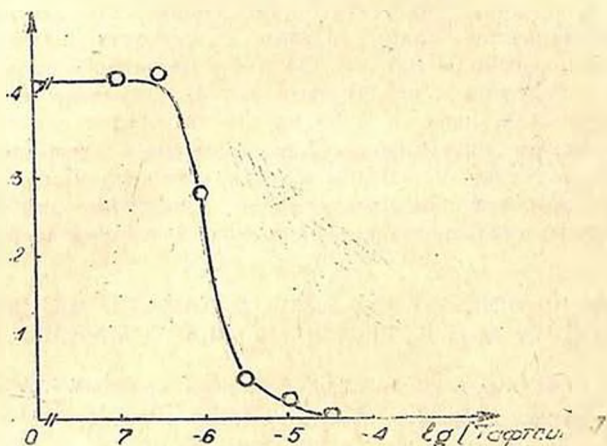


Рис. 7. Вытеснение  $[^3\text{H}]$ тафтсина немеченым пептидом с неприсоединенных клеток линии *Neuro-2A*. Реакционная смесь содержит 0,3 мкКи (5 пмоль)  $[^3\text{H}]$ тафтсина, 100 тыс. клеток и соответствующее количество немеченого пептида в 100 мкл раствора Хенкса. Инкубация 30 мин при  $37^\circ$ . Данные представляют средний результат четырех измерений

Преимущественное взаимодействие тафтсина с нервной тканью, в частности с синапсомембранами, зависимость этого процесса от времени, его обратимость и термолабильность, а также колоколообразная зависимость от концентрации ионов кальция позволяют сделать вывод о существовании на клетках НС центров связывания тафтсина. Вопрос о природе этих центров остается открытым, хотя результаты экспериментов по обработке клеток нейробластомы (*NB41A3*) трипсином указывают на ее белковый характер.

Обращает на себя внимание довольно высокое значение  $K_d$ , полученное в наших экспериментах (около 10 мкМ для мембран мозга и около 2 мкМ для клеток нейробластомы). Известно, что аналогичная величина для макрофагов и лейкоцитов составляет 50—100 нМ [2, 3]. Однако для других пептидов, в частности для опиоидных, известны участки связывания с низким сродством ( $K_d$  для Leu-энкефалина 0,7 и 55 мкМ), локализованные не в НС, а на энтероцитах [10]. Важно отметить, что несмотря на относительно низкое сродство тафтсина к обнаруженным нами центрам, именно через них могут осуще-

ствляться описанные в литературе [4, 5, 9] физиологические эффекты этого пептида на ЦНС. Так, при системном введении от 100 до 1000 мкг/кг тафтсина крысе весом 200 г концентрация пептида в крови может достигать 13—130 мкМ. Если предположить, что значительная часть пептида проникает в мозг, то его действие на ЦНС может осуществляться через обнаруженные нами центры связывания. Для объяснения полученных результатов можно предложить несколько гипотез. Во-первых, возможно, на мембранах нервных клеток существуют рецепторы, аналогичные находящимся на клетках крови, но модифицированные таким образом, что сродство к ним пептида уменьшено примерно в 100 раз. Вторая возможность заключается в связывании тафтсина с рецепторами других регуляторных пептидов, локализованных в мозгу. В этом случае становится понятным относительно высокое значение  $K_d$ . Не исключена также возможность связывания тафтсина со специфическими низкоаффинными центрами, отличными от рецепторов клеток крови. Для выяснения этого вопроса предполагается проведение ряда дополнительных экспериментов.

## TUFTSIN BINDING TO RAT BRAIN PLASMATIC MEMBRANES, RAT GLIOMA AND MURINE NEUROBLASTOMA CELL LINES

AREFYEVA I. A., ALFEEVA L. Yu., GRIVENNIKOV I. A.

Institute of Molecular Genetics Academy of Science USSR

Tuftsln specifically binds to rat brain membranes, rat glioma (C—6, NGUK—1) and murine neuroblastoma (NB41A3, Neuro-2A) cells. The binding is time-dependent, reversible and thermolabile. Optimal experimental conditions include the presence of  $\text{CaCl}_2$  (2 mM) in the incubation medium. Cells pretreatment with trypsin solution causes complete inhibition of the binding.  $K_d$  values for [ $^3\text{H}$ ]tuftsln binding to rat brain membranes and neuroblastoma cells Neuro-2A are about 10  $\mu\text{M}$  and 2  $\mu\text{M}$  respectively. Common neurotransmitters and opiate antagonist naloxone at the concentration up to 50  $\mu\text{M}$  fail to alter the binding.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Fridkin M., Najjar V. A. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., v. 24, p. 1—40, 1989.
2. Dagan S., Gottlieb P., Tzehoval E., Feldman M., Fridkin M., Yasumura K., Okamoto K., Yajima A. J. Med. Chem., v. 29, p. 1961—1965, 1986.
3. Stabinsky Y., Gottlieb P., Zakuth V., Spirer Z., Fridkin M. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 83, p. 599—606, 1978.
4. Вальдман А. В., Козловская М. М., Ашмарин И. П., Минеева М. Ф., Анохин К. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 92, с. 31—33, 1981.

Авторы выражают глубокую благодарность Д. А. Зайцеву за предоставленные препараты [ $^3\text{H}$ ]тафтсина и С. В. Зайцеву за критическое обсуждение полученных результатов.

5. Вальдман А. В., Бондаренко В. А., Козловская М. М., Русаков Д., Калихевич В. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 93, с. 49—52, 1982.
6. Минеева М. Ф. — В кн.: Нейрохимические основы психотропного эффекта, с. 53—67, М., НИИ фармакологии АМН СССР, 1982.
7. Gray E. G., Whittaker V. P. J. Anat., v. 96, p. 79—87, 1962.
8. Cadman E., Bostwick J. R., Eichberg J. J. Anal. Biochem., v. 96, p. 21—23, 1979.
9. Herman Z. S., Stachura Z., Krezeminski T., Plech A., Siemion I. Z., Nawrocka E. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 419, p. 156, 1983.
10. Lopez-Ruiz M. P., Arilla E., Gomez-Pan A., Prieto J. C. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 126, p. 404—411, 1985.

Поступила 3. XII. 1990

---

*Transmembrane Signalling, Intracellular Messengers and Implications for Drug Development (ed. S. R. Nahorski), J. Wiley and Sons, Baffins Lane, Chichester, 263 p., 1990.*

*Трансмембранный перенос сигналов, внутриклеточные передатчики и рекомендации для разработки лекарств.*

Известные эксперты международного класса из ведущих лабораторий Европы и США обсуждают последние достижения в области расшифровки структуры рецепторов, трансмембранной передачи информации, образования вторичных мессенджеров и их действия.

Впервые в пределах одной книги обеспечивается квалифицированный подход к каждой из областей и даются рекомендации по использованию препаратов, управляющих трансмембранной передачей сигналов.

В книге имеются следующие разделы:

Структурные детерминанты связывания лигандов с  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторами;

Молекулярная фармакология клонированных мускариновых рецепторов;

Подтипы G-белков: структурная идентификация и изучение функций;

Роль G-белков в сопряжении рецепторов с ионными каналами;

Трансмембранная передача сигналов G-белками;

Зависимая от G-белков регуляция фосфолипазы C в мембранах эритроцитов индейки;

Модуляция тока  $Ca$  в нейронах активированием G-белков;

G-белки и передача сигналов, регулирующих рост клеток;

Регуляция аденилатциклазы;

Рецепторы, регулирующие внутриклеточный уровень  $Ca^{2+}$ ;

Инозитолфосфатазы как внутриклеточные вторичные мессенджеры;

Управление переноса  $Ca^{2+}$  рецепторами;

Синтез и биология аналогов вторичных мессенджеров.