



УДК 577.112.6

СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ И ПРОНИКНОВЕНИЕ ВНУТРЬ КЛЕТКИ-МИШЕНИ ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕННОГО МИЕЛОПЕПТИДА-4, ОБЛАДАЮЩЕГО ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2006 г. С. А. Гурьянов[#], Е. А. Кирилина, С. В. Хайдуков, Н. И. Суворов,
И. М. Молотковская, А. А. Михайлова

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 09.12.2005 г. Принята к печати 07.06.2006 г.

С помощью введения флуоресцеинизотиоцианатной метки в регуляторный пептид костномозгового происхождения миелопептид-4 (МП-4) (Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro), индуцирующий терминальную дифференцировку клеток лейкозной линии HL-60, изучена его способность специфически связываться с поверхностью клеток данной линии и проникать внутрь клетки. Методами цитометрии и конфокальной микроскопии показано, что МП-4 после связывания с поверхностью клеток линии HL-60 проникает в цитоплазму и локализуется в конечном итоге вокруг клеточного ядра, что, по-видимому, необходимо для проявления его дифференцировочной активности.

Ключевые слова: миелопептид-4; дифференцировка клеток; миелобластный лейкоз.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что нарушение процессов пролиферации и дифференцировки клеток в костном мозге приводит к развитию тяжелых, а часто и неизлечимых заболеваний. К таким заболеваниям относятся различные типы лейкозов. Это объясняет важность проблемы поиска новых дифференцировочных факторов, особенно эндогенной природы, которые могли бы быть использованы в противолейкозной терапии. Миелопептид-4 (Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro) относится к группе костномозговых иммунорегуляторных низкомолекулярных пептидов (миелопептидов), выделенных из супернатанта культуры клеток костного мозга свиньи, идентифицированных и синтезированных [1]. Установлено, что МП-4 индуцирует дифференцировку лейкозных клеток, что показано на миелоидных клеточных линиях HL-60 (острый миелобластный лейкоз) и К-562 (эритробластный лейкоз), а также на клетках костного мозга, полученных от пациентов с острым миелобластным лейкозом [2]. Инкубация лейкозных клеток с МП-4 приво-

дит к метаболическим сдвигам, характерным для процесса клеточной дифференцировки, к экспрессии дифференцировочных антигенов на поверхности клеток, к снижению количества бластов и появлению морфологически зрелых клеточных форм [2]. Механизм действия МП-4 на лейкозные бласты остается пока мало изученным.

В настоящей работе с помощью флуоресцентно меченного образца FITC-МП-4 изучена способность МП-4 связываться и проникать внутрь клеток линии HL-60.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение характера связывания МП-4 с клетками линии HL-60 проводилось с помощью флуоресцентно меченного аналога FITC-МП-4. В экспериментах по сравнительной оценке дифференцировочной активности МП-4 и FITC-МП-4 было показано, что введение флуоресцентной метки в МП-4 не влияет на проявляемую им биологическую активность. В таблице представлены данные по двум признакам проявления дифференцировочной активности двух пептидов: снижению пролиферации и появлению зрелых клеток – моноцитов/макрофагов. Полученные результаты показывают, что FITC-МП-4 и МП-4 обладают одинаковой способностью индуцировать терминальную дифференцировку в клетках HL-60.

С помощью цитофлуориметрии установлено, что FITC-МП-4 связывается с клетками HL-60 в

Сокращения: FITC – флуоресцеинизотиоцианат; TFA – трифторуксусная кислота; NEPES – 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота, PBS – фосфатно-солевой буфер; PMA – форбол, 12-миристинат, 13-ацетат; офВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка.

[#] Автор для связи (тел.: (095) 330-72-56; факс: (095) 330-72-10; эл. почта: stas@ibch.ru).

Сравнительная оценка влияния МП-4 и FITC-МП-4 на метаболизм (синтез ДНК) и созревание зрелых клеток (моноциты/макрофаги, %) клеток линии HL-60

Добавляемый агент	Пролиферация (включение [³ H]тимидина в ДНК)		Моноциты/макрофаги	
	(имп/мин) × 10 ⁻³	%	Количество на 100 клеток	%
– (контроль)	6.1 ± 0.7*	100	19 ± 2.1*	100
PMA (положительный контроль)	3.2 ± 0.3**	53	31.5 ± 4.5**	165
МП-4, 1 × 10 ⁻⁶ М	4.2 ± 0.4**	68	50.3 ± 4.9***	264
FITC-МП-4, 1 × 10 ⁻⁶ М	4.3 ± 0.3**	71	42.5 ± 4.4**	223

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

широком диапазоне концентраций 10⁻⁷–10⁻¹¹ М. Связывание описывается кривой насыщения, имеющей дозозависимый характер с выходом на плато при 10 нМ (рис. 1). Анализ взаимодействия FITC-МП-4 с клетками HL-60 в координатах Лайнуивера-Берка позволил рассчитать константу диссоциации, равную 1.3 нМ (рис. 1) [GraphPad PRIZM v.4.03]. Данное значение константы характерно для рецепторов средней аффинности.

Для оценки специфичности связывания МП-4 с клетками линии HL-60 были проведены эксперименты по вытеснению FITC-МП-4 избыточным количеством немеченого МП-4 или миелопептидами с другими аминокислотными последовательностями – МП-3 (Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln) или МП-6 (Val-Asp-Pro-Pro) (рис. 2). Как видно из рисунка, введение избытка немеченого МП-4 в инкубационную смесь приводит к дозозависимому снижению

интенсивности флуоресценции, т.е. к вытеснению FITC-МП-4 с сайтов связывания на клетках-мишенях (рис. 2, кривая 1). В то же время введение избытка немеченых пептидов с другой аминокислотной последовательностью, МП-3 или МП-6, не приводит к такому результату (рис. 2, кривые 2 и 3). Насыщение и обратимый характер связывания при избытке немеченого пептида той же аминокислотной последовательности позволяют утверждать, что FITC-МП-4 специфически связывается с поверхностными рецепторами клеток миелобластного лейкоза HL-60.

Из двух пептидов, отличающихся от МП-4 по первичной структуре и не вытесняющих FITC-МП-4 из сайтов связывания, один, МП-6, также обладает дифференцировочной активностью. Он, как и МП-4, вызывает в клетках HL-60 и К-562 метаболические изменения, характерные для

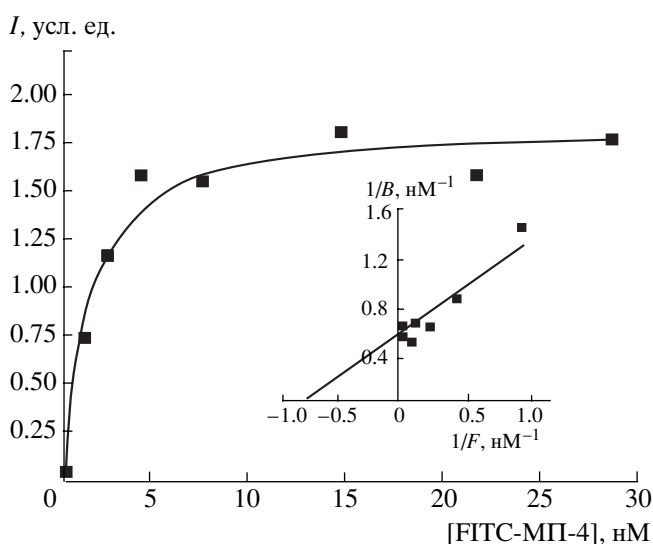


Рис. 1. Кривая насыщения связывания FITC-МП-4 с поверхностными рецепторами клеток линии HL-60. На врезке: графический анализ в координатах Лайнуивера-Берка связывания FITC-МП-4 с клетками HL-60; F и B – концентрация свободного и связанного МП-4.

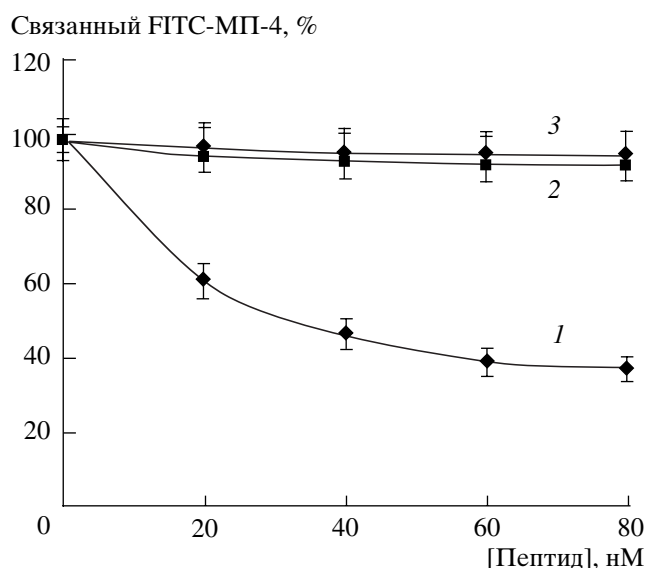


Рис. 2. Кривые вытеснения FITC-МП-4 с поверхности клеток линии HL-60 избытком пептидов МП-4 (1), МП-3 (2) и МП-6 (3).

процесса дифференцировки, индуцирует экспрессию дифференцировочных антигенов на поверхности этих клеток, вызывает снижение количества бластов и появление зрелых форм [3].

Таким образом, два эндогенных регуляторных пептида, различающиеся по первичной структуре и, возможно, имеющие разные сайты связывания, обладают одинаковой биологической активностью, что представляет интерес для изучения природы такого явления.

С помощью конфокальной микроскопии было показано, что FITC-МП-4 не только специфически связывается с поверхностью клеток HL-60, но и проникает в цитоплазму этих клеток. Установлено проникновение пептида внутрь клетки и его локализация вокруг клеточного ядра. Результаты экспериментов представлены на рис. 3. Клетки HL-60 просматривали в микроскопе через различные промежутки времени после добавления к ним FITC-МП-4 и фотографировали. Было показано, что через 1 мин после инкубации клеток HL-60 с FITC-МП-4 меченый пептид проникает в межклеточное пространство (рис. 3а), а уже через 10 мин (рис. 3б) практически полностью находится на поверхности клеток. Через 30 мин после начала инкубации FITC-МП-4 обнаруживается в цитоплазме (рис. 3в), а через 40 мин (рис. 3г) меченый пептид локализуется вокруг клеточного ядра. Повидимому, с этого момента начинаются показанные нами ранее метаболические сдвиги, характерные для дифференцировки клеток – снижение синтеза ДНК (снижение пролиферации) с одновременным усилением синтеза общего белка (клеточное созревание) [4].

В настоящее время известно достаточное число пептидов различной природы, обладающих способностью проникать внутрь клетки и локализоваться на поверхности ядра клетки [5]. Предположительно, это свойство связано с наличием определенной конформации у этих пептидов. Как правило, они характеризуются спиралевидной вторичной структурой и обладают повышенным содержанием аминокислотных остатков Arg в первичной структуре, так называемые Arg-насыщенные пептиды [6–8]. Исследованный в данной работе МП-4 также имеет в своей первичной структуре два остатка Arg.

Дифференцировочный эффект МП-4 был показан не только на лейкозных клеточных линиях HL-60 и К-562 [3, 4], но и на клетках костного мозга больных острым миелобластным лейкозом. FITC-МП-4 избирательно соединялся с бластами костного мозга больных этим типом лейкоза [9]. Все это указывает на перспективность использования данного эндогенного регуляторного пептида в противолейкозной терапии.

Выявленные с помощью флуоресцентно меченного МП-4 факты специфического связыва-

ния МП-4 с поверхностными рецепторами и проникновения пептида внутрь клетки поднимают вопросы о пусковых механизмах индукции дифференцировки в клетках HL-60 под влиянием МП-4. Остается неясным, что является решающим моментом для проявления активности МП-4, его связывание с поверхностью или прохождение в цитоплазму, какие сигнальные пути задействованы в реализации дифференцировочных процессов клеток линии HL-60 под влиянием МП-4. Все эти вопросы требуют дальнейшего изучения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез пептидов. Пептиды МП-4 (Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro), МП-3 (Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln) и МП-6 (Val-Asp-Pro-Pro) были синтезированы твердофазным методом на автоматическом синтезаторе пептидов Biosearch 9600 (США) на РАМ-полимере. Синтез осуществлялся Fmoc/DIPCDI-методом. В работе использовали аминокислоты и их производные (Sigma, США) или производные, полученные по стандартным методикам. Полученные пептиды выделяли методом офВЭЖХ на колонке Whatman Partisil 5 ODS-3 (Whatman Inc., США) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% TFA (Fluka, Швейцария). Методом масс-спектрометрии и данными секвенирования показана идентичность синтезированных пептидов их нативной структуре. МП-3 имел молекулярный ион $[M]^+ = 721$, МП-4 – 1016, МП-6 – 426. Определение проводилось масс-спектрометрически на приборе Thermo Bioanalysis Vision 2000 (Англия) с УФ-лазером при 337 нм и импульсе 33 нс. Аминокислотную последовательность пептидов определяли на газофазном секвенаторе (477A Applied Biosystem, США), соединенном с автоматическим анализатором фенилтиогидантоинов аминокислот (модель 120A той же фирмы). По данным аналитической офВЭЖХ, синтезированные пептиды были гомогенны.

Синтез FITC-МП-4. К 2 мг МП-4, растворенного в 500 мкл DMSO, добавляли 3.9 мг флуоресцеинизотиоцианата (FITC) (ICN, США), растворенного в 5 мл 0.1 М бикарбонатном буфере, pH 9.0. После часового перемешивания при 20°C реакционный объем помещали на холод (+4°C) на 24 ч. Контроль за ходом реакции и выделение меченого пептида проводили методом офВЭЖХ в хроматографической системе SCL-10 Avp (Shimadzu, Япония) на колонке Ультрасфера C18 (4.6 × 250 мм) (Beckman, США) в градиенте концентрации водного ацетонитрила (Криохром, Россия) в 0.1% TFA. Время удерживания (мин) МП-4 – 14.1; FITC-МП-4 – 19.2. Расчетная молекулярная масса FITC-МП-4 совпала с данными масс-спектрометрии, $M_r = 1406$.

Культивирование клеток линии HL-60 проводили в стандартной среде RPMI-1640 (ICN, США),

содержащей 7% ЭТС (GIBCO, Англия), 20 мМ HEPES-буфер (Flow Laboratories, Англия), 2 мМ L-глутамин (Flow Laboratories, Англия) и 50 мкг/мл гентамицина (Брынцалов Ферейн, Россия). Клетки культивировали в полистироловых флаконах в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C во влажной атмосфере и 5% CO₂. Каждые 48 ч клетки просматривали в микроскопе, и, в зависимости от наросшего количества клеток, либо добавляли полную среду для инкубации (как описано выше), либо клетки рассевали в новые флаконы и инкубировали снова до тех пор, пока не накапливали нужного для эксперимента количества клеток.

Включение радиоактивной метки – [³H]тимидина. Клетки HL-60 высевали в 96-луночные планшеты в количестве 20000 клеток/луночку. Через 24 ч во все лунки (кроме контрольных) добавляли дифференцировочные факторы в различных концентрациях (разведения были подобраны таким образом, что в каждую лунку добавляли вещества в одинаковом объеме среды (50 мкл): МП-4 или PMA). В контрольные лунки помещали эквивалентное количество полной среды. [³H]тимидин (1 мкКи на лунку) вносили на четвертые сутки культивирования. Планшеты помещали на 4.5 ч в CO₂-инкубатор, затем переносили на 24 ч в холодильник (при –28°C). Перед измерением включения [³H]тимидина планшеты размораживали и содержимое каждой лунки переносили на отдельный фильтр из целлюлозы. Образцы оставляли при комнатной температуре на 24 ч до полного высыхания. Далее каждый фильтр помещали в отдельный флакон со сцинтилляционной жидкостью. Измерение меченой ДНК проводили на сцинтилляционном счетчике LKB (Швеция).

Морфологический анализ. Морфологию клеток HL-60 оценивали на 8-е сут культивирования. Готовили мазки клеток на покровных стеклах, фиксировали метанолом в течение 5 мин и окрашивали азур-эозином по Романовскому-Гимзе [10]. Подсчет промоноцитов, моноцитов и макрофагов проводили под иммерсией на микроскопе Leitz (Германия).

Цитофлуориметрический анализ. После инкубации клетки отмывали центрифугированием (2 раза при 1000 об/мин по 3–5 мин и готовили суспензию клеток 1 × 10⁶/мл в PBS-буфере (ICN, США), содержащим 1% ЭТС. Образцы (200000 клеток на образец) инкубировали с FITC-МП-4 в концентрациях 10⁻⁷–10⁻¹¹ М в течение 40 мин на холоду (+4°C). После этого надосадочную жидкость отделяли центрифугированием (1000 об/мин 5–7 мин), далее клетки дважды промывали исходным буфером, ресуспендировали и анализировали на проточном цитофлуориметре EPICS-5 (Coulter Electronics Inc., США). При конкурентном поверхностном взаимодействии предварительно отмывые от среды клетки линии HL-60 в PBS, содержащие 1%

ЭТС, инкубировали с FITC-МП-4 в концентрации 10 нМ (40 мин, +4°C). Далее образцы инкубировали с немечеными МП-4, МП-6 или МП-3 в концентрациях от 10 до 100 нМ в течение 40 мин (+4°C). После второй инкубации клетки дважды отмывали центрифугированием (1000 об/мин, 5–7 мин) и анализировали в проточном цитофлуориметре.

Конфокальная микроскопия. Клетки линии HL-60 рассаживали в 96-луночные планшеты по 100000 клеток в 100 мкл на лунку в стандартной среде для культивирования (раздел “Культивирование клеток”), содержащей 10% ЭТС. Далее к клеткам добавляли FITC-МП-4 в концентрации 1 нМ и инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO₂ в течение 10, 30 и 40 мин. Из клеток, инкубированных 10 мин, сразу готовили образцы на стеклах для просмотра в микроскопе Carl Zeiss (Германия) под объективом Plan-Neofluar 100×/1.3 oil Ph 3. Клетки, инкубированные в течение 30 и 40 мин, перед приготовлением образцов для микроскопии сначала отмывали центрифугированием (10 мин, 1000 об/мин). Кроме этого, готовили образцы клеток HL-60, которые наблюдали под микроскопом сразу после добавления FITC-МП-4 (1 мин).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фони́на Л.А., Гурьянов С.А., Ефремов М.А., Смирнова О.В. // Биооргани. химия. 1998. Т. 24. С. 403–407.
2. Петров Р.В., Михайлова А.А., Фони́на Л.А., Степаненко Р.Н. Миелопептиды. М.: Наука, 2000. С. 163–167.
3. Кирилина Е.А., Суворов Н.И., Попова С.С., Фони́на Л.А., Гурьянов С.А. // Бюлл. экспер. биол. и мед. 2005. Т. 140. С. 565–570.
4. Стрелков Л.А., Михайлова А.А., Гурьянов С.А., Ефремов М.А., Петров Р.В. // ДАН. 1998. Т. 358. С. 134–136.
5. Magzoub M., Graslund A. // Quarterly Reviews of Bioph. 2004. V. 2. P. 147–195.
6. Takeshima K., Chikush A., Lee K.K., Yonehara S., Matsuzaki K. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 1310–1315.
7. Drin G., Cottin S., Blanc E., Rees A.R. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 31192–31201.
8. Magzoub M., Kilk K., Eriksson L.E., Langel U., Graslund A. // Biochim. Biophys. Acta. 2001. V. 1512. P. 77–89.
9. Попова С.С., Френкель М.А., Андреева Л.Ю., Тупицын Н.Н., Михайлова А.А. // Иммунология гемопоза / Сб. трудов ГУ РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2004. С. 37–46.
10. Ромейс Б. Микроскопическая техника: Пер. с англ. М.: Иностран. лит., 1954.

Fluorescently Labeled Differentiating Myelo peptide-4: Specific Binding to and Penetration into Target Cells

S. A. Gur'yanov[#], E. A. Kirilina, S. V. Khaidukov, N. I. Suvorov,
I. M. Molotkovskaya, and A. A. Mikhailova

[#]Phone: +7 (495) 330-7256; fax: +7 (495) 330-7210; e-mail: stas@ibch.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10,
Moscow, 117997 Russia*

Myelo peptide-4 (MP-4) (Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro), inducing the terminal differentiation of HL-60 leukemia cells, was labeled with fluorescein isothiocyanate. The specific binding of this modified peptide to the surface of HL-60 cells and its ability to penetrate into the cells were studied. It was shown by cytometry and confocal microscopy to be bound on the HL-60 cell surface, to penetrate into their cytoplasm, and finally to concentrate around the cell nucleus. These phenomena are probably necessary for the exhibition of MP-4 differentiating activity. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2006, vol. 32, no. 6; see also <http://www.maik.ru>

Key words: myelo peptide-4, cellular differentiation, myeloblast leucosis