



УДК 591.044:577.112.384.4.017

ПОЯВЛЕНИЕ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК HL-60 ПРИ ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ

© 1998 г. И. А. Костянян, Р. И. Нуриева*, Т. Н. Лепихова*, М. В. Астапова,
Е. В. Наволоцкая*, В. П. Завьялов**, В. М. Липкин#

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

*Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,
Пушино Московской области;

**Институт инженерной иммунологии, пос. Любучаны Московской области

Поступило в редакцию 5.02.98 г. Принято к печати 2.03.98 г.

С помощью радиолигандного анализа обнаружено и охарактеризовано специфическое взаимодействие *L*-глутаминовой кислоты с клетками промиелоцитарного лейкоза HL-60, дифференцированными полностью-транс-ретиноевой кислотой (K_d 0.5 мкМ) и фракцией плазматических мембран, выделенной из этих клеток (K_d 1 мкМ). Установлено, что немеченый структурный аналог глутаминовой кислоты квискалат конкурентно ингибирует специфическое связывание *L*-[^3H]Glu с мембранами (K_i 0.24 мкМ). Проявлена стереоспецифичность связывания. Полученные данные свидетельствуют о появлении в процессе дифференцировки на поверхности клеток HL-60 специфических глутаматных рецепторов.

Ключевые слова: *L*-глутаминовая кислота, полностью-транс-ретиноевая кислота, клетки HL-60, глутаматные рецепторы, дифференцировка.

Известно, что полностью-транс-ретиноевая кислота (РК) подавляет рост и вызывает дифференцировку клеток линии HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека по гранулоцитарному пути *in vitro* [1–3], *in vivo* она оказывает аналогичное действие на промиелоцитарные лейкоэмические клетки, полученные из крови больных острым лейкозом [4]. Дифференцированные под действием РК клетки морфологически близки к гранулоцитарным нейтрофилам и способны к хемотаксису и фагоцитозу [2]. Установлено, что дифференцирующее воздействие РК на лейкозные клетки опосредовано ее взаимодействием с α -рецептором к ретиноевой кислоте (RAR- α) [5].

Недавно нами была обнаружена способность *L*-глутаминовой кислоты накапливаться в среде культивирования клеток HL-60, обработанных РК, и при концентрациях 10^{-8} – 10^{-6} М подавлять рост клеток исходной линии и вызывать дифференцировку по гранулоцитарному пути [6–8]. Одновременно было показано отсутствие у недифференцированных клеток HL-60 специфических глутаматных рецепторов. Антипролиферативное и дифференцирующее действие *L*-глутаминовой кислоты на эти клетки, по всей вероятности, опосредовано ее влиянием на рецепцию цитокинов,

вовлеченных в процесс дифференцировки клеток HL-60 по гранулоцитарному пути (интерлейкин- 1β , фактор некроза опухоли альфа, интерлейкин-6) [6–8].

Наличие на РК-обработанных клетках глутаматсвязывающих участков было показано методом радиолигандного анализа с использованием ^3H -меченой *L*-глутаминовой кислоты (рис. 1).

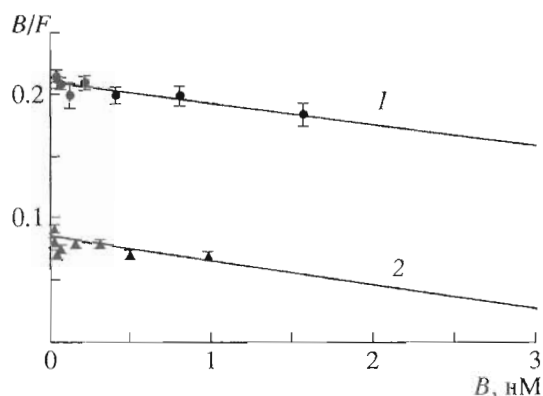


Рис. 1. Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания *L*-[^3H]Glu с дифференцированными АТРА клетками HL-60 (1) и фракцией плазматических мембран, выделенной из этих клеток (2). *B* и *F* – молярные концентрации специфически связавшейся и свободной *L*-[^3H]Glu.

Автор для переписки (тел.: (095) 336-61-66; факс: (095) 310-70-07; e-mail: Lipkin@ibch.siohs.ras.ru).

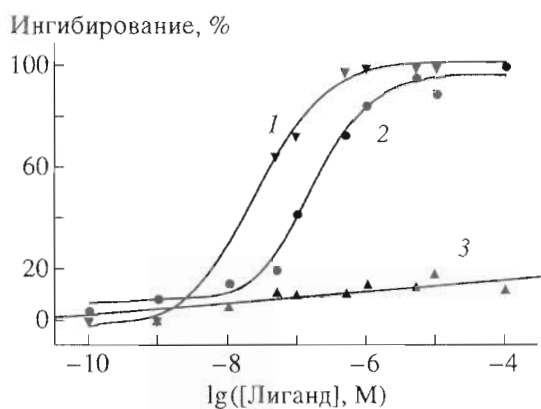


Рис. 2. Ингибирование немечеными лигандами специфического связывания L - $[^3\text{H}]\text{Glu}$ с фракцией плазматических мембран АТРА-обработанных клеток HL-60: квискалатом (1), L -Glu (2), D -Glu (3).

Графики Скэтчарда, характеризующие специфическое связывание $[^3\text{H}]\text{Glu}$ с дифференцированными клетками HL-60 (рис. 1, 1) и мембранами, выделенными из этих клеток (рис. 1, 2), представляют собой прямые линии, что свидетельствует о наличии одного класса рецепторов с K_d 0.5 и 1 мкМ соответственно. Степень неспецифического связывания L - $[^3\text{H}]\text{Glu}$ определена в присутствии 10^{-3} М немеченой L -глутаминовой кислоты. Ее величина составляла для клеток $0.18 \pm 0.06\%$ и для мембран $0.1 \pm 0.03\%$ от величины общего связывания L - $[^3\text{H}]\text{Glu}$. Плотность рецепторов (n , среднее число глутаматсвязывающих участков, приходящееся на одну клетку) была равна 7.8×10^6 .

Для оценки специфичности идентифицированных рецепторов были проведены эксперименты по ингибированию связывания L - $[^3\text{H}]\text{Glu}$ немечеными L - и D -глутаминовой кислотами и агонистом глутаматных рецепторов мозга квискалатом, структурным аналогом L -глутаминовой кислоты. Результаты экспериментов, суммированные в таблице, свидетельствуют о том, что способностью ингибировать связывание L - $[^3\text{H}]\text{Glu}$ с РК-обработанными клетками HL-60 обладали L -глутаминовая кислота (K_i 0.7 мкМ) и квискалат (K_i 0.24 мкМ). Соответствующие кривые ингибирования приведены на рис. 2. D -Глутаминовая кислота в диапазоне концентраций 10^{-10} – 10^{-5} М не ингибировала связывание. Полученные ре-

Ингибирование специфического связывания L - $[^3\text{H}]\text{Glu}$ с клетками HL-60, обработанными РК

| Лиганд | IC_{50} , мкМ | K_i , мкМ |
|-----------|-----------------|-----------------|
| L -Glu | 1.4 ± 0.1 | 0.7 ± 0.1 |
| D -Glu | >100 | >100 |
| Квискалат | 0.31 ± 0.02 | 0.24 ± 0.01 |

зультаты свидетельствуют о стереоспецифичности выявленных глутаматных рецепторов и их чувствительности к квискалату.

Таким образом, нами впервые обнаружено, что обработка клеток HL-60 *полностью-транс*-ретиновой кислотой приводит к появлению на них специфических глутаматных рецепторов. Показано, что эти глутаматсвязывающие участки локализованы во фракции плазматических мембран, стереоспецифичны и чувствительны к агонисту глутаматных рецепторов мозга квискалату. Полученные данные являются еще одним свидетельством прямого участия L -глутаминовой кислоты и ее рецепторов в функционировании иммунной системы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали L - $[6\text{-}^3\text{H}]\text{Glu}$ с удельной активностью 56 Ки/ммоль (Amersham, Англия); немеченые L - и D -глутаминовую кислоту, квискалиновую кислоту (β - $[3,5\text{-двокси-}1,2,4\text{-оксадиазолидин-}2\text{-ил}]\text{-}L$ -аланин) (Sigma, США), жидкий сцинтиллятор "Ready Gel" (Beckman, США).

Остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы Мопо-Q (Millipore, США).

Полностью-транс-ретиновая кислота была любезно предоставлена А.Н. Ходоновым (Московская государственная академия тонкой химической технологии), а клеточная линия HL-60 – Р.Г. Васильевым (Институт биотехнологии, Москва).

Клетки HL-60 обрабатывали 1 мкМ РК как описано в работе [3].

Плазматические мембраны получали по методу [9].

Реакцию связывания L - $[^3\text{H}]\text{Glu}$ (диапазон концентраций 10^{-10} – 10^{-5} М) с клетками HL-60 (10^6 клеток/мл) и фракцией плазматических мембран (0.4 мг белка/мл) проводили как описано ранее [10].

Статистическую обработку результатов, полученных из двух независимых экспериментов, проводили с помощью программы "Excel".

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 97-04-49462) и Международного научно-технического центра (МНТЦ) (проект 463).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Collins S.J., Gallo R.C., Gallagher R.E. // *Nature*. 1977. V. 270. P. 347–349.
2. Breitman T.R., Selonick S.E., Collins S.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980. V. 77. P. 2936–2940.
3. Grande A., Manfredini R., Tagliafico E., Balestri R., Pizzanelli M., Papa S., Zucchini P., Ponsi L., Bagnara G., Torelli U., Ferrari S. // *Exp. Hematol.* 1995. V. 23. P. 117–125.
4. Warrell R.P., Frankel S.R., Miller W.H., Scheinberg D.A., Itri L.M., Hittelman W.N., Vyas R., Andreeff M., Tafuri A., Jakubowski A., Gabrilove J., Gordon M.S., Dmitrovsky E. // *New Engl. J. Med.* 1991. V. 234. P. 1385–1392.
5. Collins S.J., Robertson K.A., Mueller L. // *Mol. Cell Biol.* 1990. V. 10. P. 2154–2159.
6. Костанян И.А., Нуриева Р.И., Наволоцкая Е.В., Астапова М.В., Драницына С.М., Завьялов В.П., Липкин В.М. // *Биоорган. химия*. 1998. Т.24. С. 3–9.
7. Костанян И.А., Нуриева Р.И., Наволоцкая Е.В., Астапова М.В., Драницына С.М., Завьялов В.П., Липкин В.М. // *Молекуляр. биология*. 1998. Т. 32. С. 152–157.
8. Kostanyan I.A., Nurieva R.I., Navolotskaya E.V., Astapova M.V., Dranitsyna S.M., Zav'yalov V.P., Lipkin V.M. // *Immunol. Lett.* 1998 (in press).
9. Dods R.F., Essner E., Barclay M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972. V. 46. P. 1074–1081.
10. Костанян И.А., Наволоцкая Е.В., Нуриева Р.И., Завьялов В.П., Липкин В.М. // *Биоорган. химия*. 1997. Т. 23. С. 805–808.

Appearance of Glutamate Receptors on the Surface of HL-60 Cells upon Differentiation

I. A. Kostanyan*, R. I. Nurieva**, T. N. Lepikhova**, M. V. Astapova*,
E. V. Navolotskaya**, V. P. Zav'yalov***, V. M. Lipkin**

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

**Pushchino Branch, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

***Institute of Engineering Immunology, Lubuchany, Moscow oblast, Russia

A specific interaction of *L*-glutamic acid with promyelocytic leukemia HL-60 cells completely differentiated by *all-E*-retinoic acid ($K_d = 0.5 \mu\text{M}$) and by plasma membrane fraction from the same cells ($K_d = 1 \mu\text{M}$) was detected through radioligand analysis and characterized. Quisqualate, a nonlabeled structural analogue of glutamic acid, was found to inhibit competitively the specific binding of *L*-[^3H]glutamic acid to the membranes ($K_i = 0.24 \mu\text{M}$). The stereospecificity of the binding was demonstrated. These data suggest that specific glutamate receptors appear on the surface of HL-60 cells during their differentiation.

Key words: *L*-glutamic acid, *all-E*-retinoic acid, HL-60 cells, glutamate receptors, differentiation

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 336-6166; fax: +7 (095) 310-7007; e-mail: Lipkin@ibch.siobc.ras.ru.