



УДК 577.112.384.4.017

L-ГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА – МОДУЛЯТОР ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК КРОВИ МИЕЛОИДНОГО РЯДА

© 1999 г. М. В. Астапова, В. М. Липкин, М. В. Архипова, С. Г. Андреева, С. М. Драницына,
М. И. Меркулова, Р. И. Нуриева*, Е. В. Наволоцкая*, И. А. Костянян[#]

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

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

Поступила в редакцию 26.03.99 г. Принята к печати 17.05.99 г.

Изучено влияние *L*-глутаминовой кислоты на дифференцировку клеток линий HL-60 и К-562, а также на уровень экспрессии в них мРНК IL-1 β , IL-6 и TNF α . Показано, что фактор некроза опухоли является активным индуктором дифференцировки клеток этих линий, а *L*-глутаминовая кислота потенцирует его действие. Результаты исследования указывают на то, что *L*-Glu играет важную роль модулятора физиологического состояния клеток крови миелоидного ряда, изменяя, в частности, восприятие и экспрессию этими клетками функционально важных для них цитокинов.

Ключевые слова: *L*-глутаминовая кислота; клетки HL-60, клетки К-562; дифференцировка; экспрессия цитокинов; фактор некроза опухоли.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее из среды культивирования клеток промиелоцитарного лейкоза человека линии HL-60, обработанных *полностью-транс*-ретиноевой кислотой нами был выделен низкомолекулярный фактор, подавляющий пролиферацию и индуцирующий дифференцировку клеток исходной линии по гранулоцитарному пути. Аминокислотный и масс-спектрометрический анализ структуры этого фактора показали, что он является глутаминовой кислотой [1, 2]. Это казалось невероятным, поскольку изначальное содержание *L*-Glu в среде культивирования клеток составляло 0.13 мМ. Однако дансирование NH₂-групп в среде без кислотного гидролиза продуктов реакции с последующей двумерной ТСХ показало отсутствие в растворе свободной *L*-Glu. При этом оказалось, что дифференцирующая активность *L*-Glu проявляется только при добавлении в среду ее водного раствора. При растворении *L*-Glu в среде, содер-

жащей фетальную сыворотку теленка, ее дифференцирующая активность исчезает. Дифференцирующая активность *L*-Glu не проявляется и при добавлении ее в растворе альбумина. Вероятно, что в этих случаях *L*-Glu находится в связанном с белками состоянии.

Нами была изучена зависимость дифференцирующей активности *L*-Glu от концентрации. Оказалось, что зависимость эта имеет колоколообразный характер с максимальным эффектом при концентрации 10⁻⁷ М. При концентрациях выше 10⁻⁶ М и ниже 10⁻⁸ М эффект отсутствует. Растворы других аминокислот (Gln, Asp, Val, Pro, Cys), а также сукцината и глутарата натрия при тех же концентрациях дифференцирующей активностью не обладают [3].

Известно, что *L*-Glu выполняет важнейшую нейромедиаторную функцию в центральной нервной системе и действует через различные типы глутаматных рецепторов [4]. Однако все наши попытки идентифицировать глутаматные рецепторы как на поверхности, так и внутри клеток HL-60 оказались безуспешными. Рецепторы к *L*-Glu не были обнаружены на недифференцированных клетках, но было показано, что после индукции этих клеток *полностью-транс*-ретиноевой кислотой на их поверхности появляются низкоаффинные квисквалатчувствительные глутаматные рецепторы [5]. В процессе изучения

Сокращения: rHuIL-1 β – рекомбинантный человеческий интерлейкин-1 β ; rHuTNF α – рекомбинантный человеческий фактор некроза опухоли α ; rHuIL-6 – рекомбинантный человеческий интерлейкин-6; 1,25(OH)₂D₃ – 1,25 дигидроксивитамин D₃; TPA – 12-*O*-тетрадеканонилфорбол, 13-ацетат; RT-PCR – обратнотранскриптная полимеразная цепная реакция; NBT – нитроголубой тетразолий; FAS – фактор апоптотической чувствительности.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 336-55-11; факс: (095) 310-70-10; e-mail: kost@ibch.siobc.ras.ru).

молекулярного механизма дифференцирующего действия *L-Glu* на клетки HL-60 было обнаружено влияние этой аминокислоты на рецепцию клетками ряда цитокинов, вовлеченных в процесс дифференцировки. Показано, что в концентрации 10^{-7} М *L-Glu* ингибирует высокоаффинное связывание rHuIL-1 β и rHuIL-6, но увеличивает число рецепторов к rHuTNF α в 2.5 раза, снижая тем самым чувствительность клеток к пролиферативным сигналам интерлейкинов и повышая дифференцирующий эффект фактора некроза опухоли [3, 6, 7].

В литературе описан еще один фактор дифференцировки, p48, выделенный из среды культивирования клеточной линии пре-B-клеточного лейкоза человека Reh, который, подобно *L-Glu*, не имеет рецепторов на поверхности клеток HL-60, но индуцирует дифференцировку клеток по моноцит/макрофагальному пути [8]. Представлялось интересным сравнить изменение экспрессии в клетках HL-60 мРНК цитокинов, играющих ключевую роль в процессах дифференцировки/пролиферации, таких как IL-1 β , TNF α и IL-6, под действием *L-Glu*, p48 и других факторов, направляющих дифференцировку по двум различным путям: моноцит/макрофагальному (p48, 1,25(OH) $_2$ D $_3$, TPA) и гранулоцит/нейтрофильному (ретиноевая кислота).

Р. Холлом и сотр. было показано, что в клетках HL-60 белок p48 вызывает значительную стимуляцию экспрессии мРНК IL-1 β и TNF α и не влияет на уровень экспрессии мРНК IL-6 [9]. Это согласуется с данными о том, что моноцит/макрофагальная дифференцировка сопровождается увеличением экспрессии мРНК IL-1 β и TNF α , а также соответствующих им белков [10, 11]. Исключение составляет действие гидроксиметаболита витамина D $_3$, который увеличивает уровень экспрессии мРНК TNF α при неизменном уровне экспрессии белка в культуральной среде и в клетках [12]. При обработке клеток HL-60 полностью-транс-ретиноевой кислотой активируется экспрессия всех вышеперечисленных цитокинов [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы показали, что в пролиферирующих клетках HL-60 наблюдается исходно достаточно высокий уровень мРНК IL-1 β , который после обработки *L-Glu* постепенно снижается (рис. 1а). Данные о высоком содержании IL-1 β в HL-60 хорошо согласуются с результатами Т. Татсуда [14]. Однако в других работах [9, 13] отмечают следовые количества мРНК этого цитокина. Такое различие может быть объяснено использованием разных сублиний клеток HL-60. Известно, что клетки с высоким уровнем экспрессии IL-1 β имеют

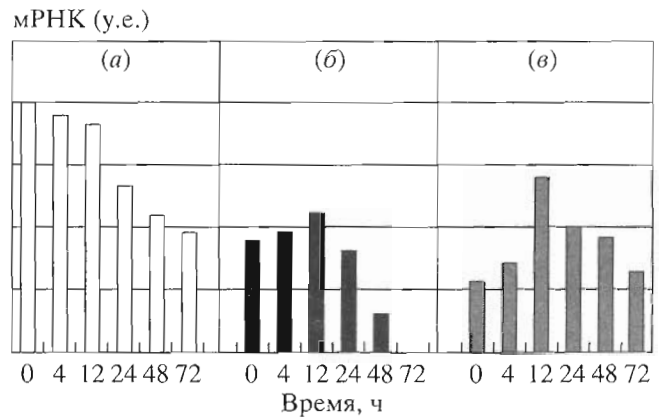


Рис. 1. Гистограмма уровня экспрессии мРНК IL-1 β (а), IL-6 (б) и TNF α (в) в клетках HL-60, обработанных 0.1 мкМ *L-Glu*. По оси абсцисс представлено время после *L-Glu*-индукции (столбец 0 ч соответствует уровню экспрессии мРНК цитокина в недифференцированных клетках), по оси ординат – количество мРНК цитокинов в условных единицах.

низкий уровень активности каспазы – ICE-протеиназы (интерлейкин-1 β -конвертирующего фермента) – ключевого фермента FAS-ассоциированного апоптоза [15]. По-видимому, именно высокое содержание IL-1 β объясняет отсутствие спонтанного апоптоза в клетках нашей сублинии.

Уровень экспрессии мРНК IL-6 в процессе *L-Glu*-индуцированной дифференцировки также меняется: через 12 ч после стимуляции количество мРНК этого цитокина незначительно возрастает, однако к 72 ч она полностью исчезает (рис. 1б). Известно, что IL-1 индуцирует биосинтез IL-6 и спектр биологических активностей обоих интерлейкинов в значительной степени перекрывается [16]. И, по-видимому, исчезновение мРНК IL-6 при действии *L-Glu* связано с падением уровня экспрессии мРНК IL-1.

При дифференцировке клеток HL-60, вызванной *L-Glu*, в отличие от снижения уровня экспрессии мРНК IL-1 β и IL-6, наблюдается значительное увеличение уровня экспрессии мРНК TNF α (рис. 1в) и, параллельно с этим, – уровня экспрессии соответствующего белка (данные не показаны). Этот факт, а также экспериментальные данные о значительном увеличении числа рецепторов TNF α на клетках HL-60 после предынкубации с *L-Glu* [5], позволили нам предположить, что ключевую роль в процессе дифференцировки клеток линии HL-60 под действием этой аминокислоты играет TNF α .

С целью проверки этой гипотезы мы изучили синергизм действия *L-Glu* и TNF α . Как видно из данных, представленных на рис. 2, *L*-глутаминовая кислота в концентрации 0.1 мкМ значительно усиливает дифференцирующий эффект фактора

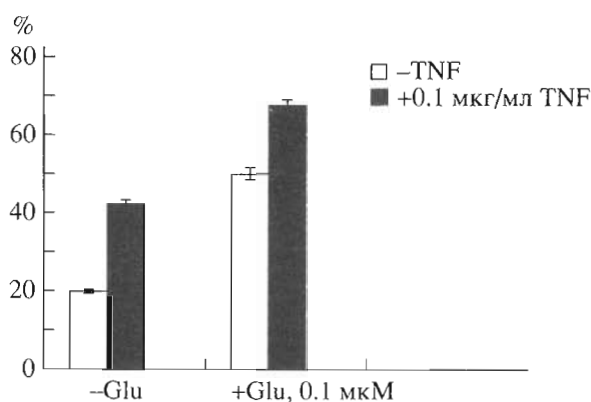


Рис. 2. Синергизм действия $TNF\alpha$ и $L-Glu$ на клетках HL-60. По оси ординат – содержание NBT-положительных клеток в %.

некроза опухоли, причем эффект $L-Glu$, был больше, если она вносилась в клеточную культуру непосредственно перед внесением $TNF\alpha$. Кроме того, нами было установлено, что моноклональные антитела к $TNF\alpha$ уменьшают дифференцирующее воздействие $L-Glu$ (результаты не представлены).

Эти данные подтверждают наше предположение о том, что в основе дифференцирующего действия $L-Glu$ на клетки HL-60 лежит эндогенный фактор некроза опухоли, который, в конечном счете, и “запускает” процесс дифференцировки, а L -глутаминовая кислота лишь потенцирует дей-

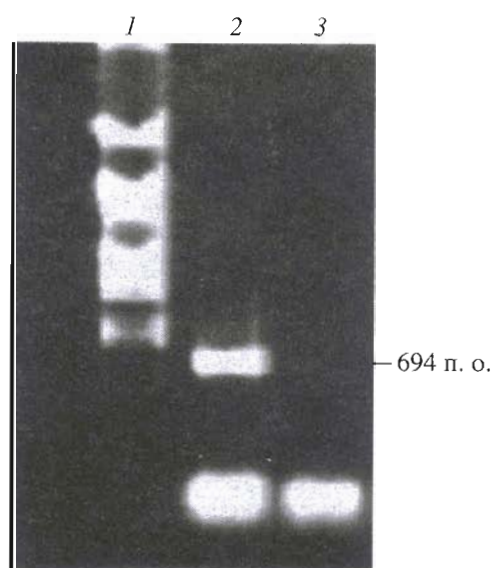


Рис. 3. Электрофорез в 1% агарозном геле окрашенных этидиумбромидом продуктов RT-PCR мРНК $TNF\alpha$ (694 п. о.) недифференцированных клеток HL-60 (дорожка 2) и K-562 (дорожка 3). В качестве стандарта (дорожка 1) использовалась ДНК фага λ , обработанная эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *HindIII*.

ствие $TNF\alpha$, “демаскируя” его мембранные рецепторы и увеличивая синтез этого белка.

Для окончательного решения вопроса мы сравнили уровень экспрессии мРНК $TNF\alpha$ в клетках HL-60 с уровнем экспрессии мРНК этого цитокина в клетках K-562, не отвечающих дифференцировкой на действие $L-Glu$ [5]. В клетках HL-60 определен исходно достаточно высокий уровень экспрессии мРНК $TNF\alpha$, тогда как в клетках монобластного лейкоза K-562 мРНК $TNF\alpha$ не обнаружена (рис. 3). Таким образом, отсутствие дифференцирующего эффекта $L-Glu$ на эти клетки связано, очевидно, с отсутствием в них $TNF\alpha$. Однако, несмотря на то что клетки K-562 $TNF\alpha$ не продуцируют, он является индуктором дифференцировки также и этих клеток, а предварительная обработка клеток K-562 $L-Glu$ значительно усиливает его эффект (рис. 4).

Вместе с тем нами была выявлена способность $L-Glu$ изменять уровень экспрессии мРНК функционально важных белков ($IL-1$, $IL-6$, рецептора $TNF\alpha$) и в клетках линии K-562 (данные не представлены).

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что именно фактор некроза опухоли является активным индуктором дифференцировки миелоидных клеток, а L -глутаминовая кислота лишь потенцирует его действие.

В целом результаты исследования указывают на то, что $L-Glu$ играет важную роль модулятора физиологического состояния клеток крови мие-

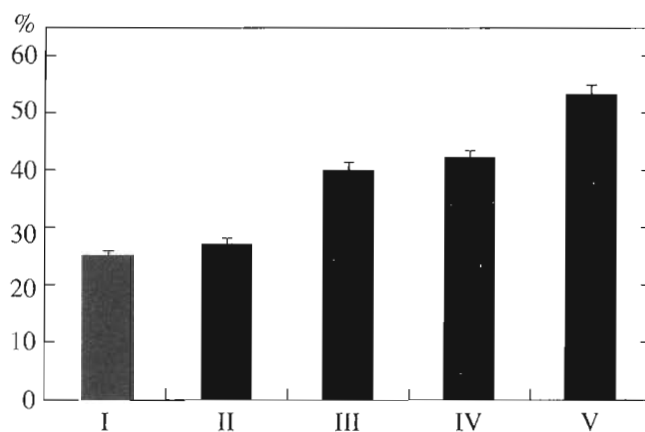


Рис. 4. Влияние $L-Glu$ на $TNF\alpha$ -индуцируемую дифференцировку клеток K-562. По оси ординат – содержание NBT-положительных клеток в %. Столбец I – недифференцированные клетки K-562 (контроль); II – клетки, обработанные 0.1 мкМ $L-Glu$; III – клетки, обработанные $TNF\alpha$ (0.2 мкг/мл); IV – клетки K-562, предварительно индуцированные $TNF\alpha$ (0.2 мкг/мл) и затем 0.1 мкМ $L-Glu$; V – клетки K-562, предварительно индуцированные 0.1 мкМ $L-Glu$ и затем $TNF\alpha$ (0.2 мкг/мл).

лоидного ряда, изменяя, в частности, восприятие и экспрессию этими клетками функционально важных для них цитокинов, и обладает, по-видимому, широким спектром действия не только в нервной, но и в иммунной системе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: L-глутаминовую кислоту, RPMI 1640, фетальную сыворотку теленка, агарозу (Sigma, США), N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновую кислоту) (HEPES), гуанидинтиоцианат (Fluka, Швейцария); все остальные реактивы имели квалификацию "ос. ч.". Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы Мопо-Q (Millipore, США).

транс-Ретиноевая кислота была любезно предоставлена А.Н. Ходоновым (Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова), а клеточная линия HL-60 – Р.Г. Василовым (Институт биотехнологии, Москва).

Культивирование клеток. Клетки HL-60 и К-562 выращивали в среде RPMI 1640 с 10% фетальной сывороткой теленка. Для определения уровня экспрессии белков клетки HL-60 адаптировали к бессывороточной среде RPMI 1640, содержащей 20 мкМ этаноламин, аскорбиновую кислоту (3 мкг/мл), 500 мкМ цитрат железа и микроэлементы. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Дифференцирующую активность определяли по способности восстанавливать нитроголубой тетразолий (NBT-тест) на четвертые сутки после индукции дифференцировки [17].

Определение уровня экспрессии цитокинов в процессе дифференцировки. Клетки линии HL-60 однократно стимулировали 0.1 мкМ L-Glu и последовательно через 4, 12, 24, 48 и 72 ч отбирали по 2 × 10⁶ клеток для выделения суммарной мРНК. мРНК выделяли с помощью гуанидинтиоцианатного метода [18] и на ее основе синтезировали первую цепь кДНК. Уровень экспрессии каждого цитокина определяли с помощью количественного метода RT-PCR, используя для каждого цитокина специфические прямые и обратные праймеры [13]. Выравнивание количества кДНК для каждого эксперимента производилось с помощью b₂-микроглобулина. Амплифицированные PCR-фрагменты подвергали электрофоретическому разделению в 1% агарозном геле и детектировали с помощью этидиумбромидом, после чего фотографировали в ультрафиолете. Фотографические негативы подвергали сканированию и обрабатывали с помощью специально разработанной денситометрической компьютерной программы.

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Н.С. Быстрову за синтез олигонуклеотидных зондов, Н.В. Пустошиловой (НИКТИ БАВ "Вектор") за любезно предоставленный TNFα и О.Г. Шамборант за моноклональные антитела к TNFα.

Работа была поддержана Международным научно-техническим центром (проект № 463) и Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 97-04-49462).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kostanyan I.A., Astapova M.V., Starovoytova E.V., Dranitsina S.M., Lipkin V.M. // FEBS Lett. 1994. V. 356. P. 327–329.
2. Костанян И.А., Астапова М.В., Старовойтова Е.В., Драницына С.М., Липкин В.М. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 243–248.
3. Костанян И.А., Наволоцкая Е.В., Нуриева Р.И., Астапова М.В., Драницына С.М., Завьялов В.П., Липкин В.М. // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. С. 3–9.
4. Pin J.P., Duvoisin R. // Neuropharmacology. 1995. V. 34. P. 1–26.
5. Костанян И.А., Нуриева Р.И., Ленихова Т.Н., Астапова М.В., Наволоцкая Е.В., Завьялов В.П., Липкин В.М. // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. С. 468–470.
6. Kostanyan I.A., Nurieva R.I., Navolotskaya E.V., Astapova M.V., Dranitsina S.M., Bogachuk A.P., Zav'yalov V.P., Lipkin V.M. // Immunol. Lett. 1998. V. 62. P. 9–13.
7. Костанян И.А., Наволоцкая Е.В., Нуриева Р.И., Астапова М.В., Драницына С.М., Завьялов В.П., Липкин В.М. // Молекуляр. биология. 1998. Т. 32. С. 152–157.
8. Hall R.E., Agarwal S., Kestler D.P., Cobb J.A., Golatein K.M., Chang N.S. // Biochem. J. 1996. V. 319. P. 919–927.
9. Kestler D.P., Agarwal S., Hall R.E. // Immunology. 1995. V. 86. P. 463–468.
10. Weinberg J.B., Mason S.N., Wortham T.S. // Blood. 1992. V. 79. P. 3337–3343.
11. Kubin M., Chow J.M., Trinchieri G. // Blood. 1994. V. 83. P. 1847–1855.
12. Steffen M., Cayre Y., Manoque K.R., Moore M.A.S. // Immunology. 1988. V. 63. P. 43–46.
13. Grande A., Manfredini R., Tahlifico E., Balestri R., Pizznelli M., Papa S., Zucchini P., Ponsi L., Bagnara G., Torelli U., Ferrari S. // Exp. Hematol. 1995. V. 23. P. 117–125.
14. Tatsuda T., Cheng J., Mountz J.D. // J. Immunol. 1996. V. 157. P. 3949–3957.

15. Takeda H., Iwamoto S., Sugimoto H., Ishii N., Kumaki S., Taraka N., Marikata H., Takamura M., Sugamura K. // *Nature*. 1992. V. 257. P. 338–340.
16. Kawana M., Hirano T., Masuda T. // *Nature*. 1988. V. 318. P. 83–85.
17. Onozaki K., Urawa H., Tamatani T., Iwamuta Y., Hashimoto T., Baba T., Suzuki H., Matsushima K. // *J. Immunol.* 1988. V. 140. P. 112–119.
18. Chomczynski P., Sacchi N. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 162. P. 156–159.

***L*-Glutamic Acid, a Modulator of the Physiological State of Myeloid Blood Cells**

M. V. Astapova*, V. M. Lipkin*, M. V. Arkhipova*, S. G. Andreeva*, S. M. Dranitsyna*, M. I. Merkulova*, R. I. Nurieva, E. V. Navolotskaya**, and I. A. Kostanyan****,

* *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, pr. Nauki 6, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia*

The effects of *L*-glutamic acid on the differentiation of HL-60 and K-562 cell lines and on the expression level of mRNAs encoding IL-1 β , IL-6, and TNF α were studied. It was shown that TNF α actively induces the differentiation of these cell lines, whereas *L*-glutamic acid enhances its effect. Our results indicated that *L*-glutamic acid modulates the physiological state of the myeloid cell line in blood, in particular, by affecting both the reception and expression of cytokines functionally important for these cells.

Key words: L-glutamic acid, HL-60 cells, K-526 cells, differentiation, expression of cytokines, tumor necrosis factor

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 336-5511; fax: +7 (095) 310-7010; e-mail: kost@ibch.siobc.ras.ru.