



УДК 577.112.6.016

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ПЕПТИДНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ IL-2 ЧЕЛОВЕКА

© 2012 г. Л. В. Оноприенко*., #, И. И. Михалева*, Б. О. Войтенков**, В. Т. Иванов*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**ООО Исследовательский центр "Комкон", г. Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 06.10.2011 г. Принята к печати 27.12.2011 г.

Показано, что синтетические пептиды последовательности 59–72, 60–72 и 61–72 интерлейкина 2 человека (IL-2), модифицированные ацетильной и метоксигруппой по их N- и C-концевым функциям, соответственно, обладают выраженными гепатопротекторными свойствами. В экспериментах *in vivo* эти пептиды нейтрализовали действие на печень таких токсинов, как тетрахлорметан и галактозамин, что проявлялось в нормализации продолжительности тиопенталового наркоза у экспериментальных животных и уровня гепатоспецифичных ферментов в их крови. Гепатопротекторная активность самого активного из исследуемых пептидов (59–72) оказалась аналогичной действию преднизолона (противовоспалительное средство), в то время как цитотоксический дипептид бестатин не оказывал подобного гепатозащитного эффекта. Показано, что мишенью гепатопротекторного действия пептидов являются предварительно активированные перитонеальные макрофаги. По-видимому, действие (59–72)-пептида приводит к переходу классически активированных макрофагов в состояние, близкое к их альтернативной активации.

Мы предположили, что гепатопротекторная активность пептидов связана с их взаимодействием с α -субъединицей рецептора интерлейкина 2 человека (IL-2R α), поскольку, согласно данным рентгеноструктурного анализа, именно в этом районе IL-2 находится один из участков его связывания с IL-2R α . Эксперименты по влиянию самого активного (59–72)-пептида на рост IL-2-зависимой клеточной линии CTLL подтвердили это предположение. Было показано, что ^3H -меченный пептид последовательности 59–72 связывается с клетками CTLL. Если предположить, что связывание пептида специфично и происходит именно с IL-2R α , то условно определенная в этом эксперименте константа связывания (1.41×10^{-6} M) сопоставима с таковой для взаимодействия IL-2 с IL-2R α ($\sim 10^{-7}$ M).

Ключевые слова: интерлейкин 2, синтетические пептиды, рецептор интерлейкина 2, α -субъединица рецептора интерлейкина 2.

ВВЕДЕНИЕ

Интерлейкин-2 (IL-2) проявляет свойства ростового фактора и является одним из важнейших регуляторных белков иммунной системы. Он играет ключевую роль в инициации, развитии и завершении иммунного ответа. Мишенями IL-2 являются различные популяции клеток иммунной системы, включая T- и B-клетки и макрофаги [1].

Сокращения: CTLL – интерлейкин-2-зависимая клеточная линия, FCS – эмбриональная телячья сыворотка, IL – интерлейкин, IL-2R – рецептор интерлейкина 2, IL-2R α , IL-2R β , IL-2R γ – α , β и γ субъединицы рецептора IL-2 соответственно, LPS – липополисахарид, NK-клетки – естественные киллерные клетки, PMA – 4- β -форбол-12- β -мир-стат-13- α -ацетат, TNF- α – α -фактор некроза опухоли.

Автор для связи: тел.: +7 (495) 335-53-66; эл. почта: onolv@mail.ru.

Ранее в Институте биоорганической химии были проведены иммунохимические исследования как самого IL-2 человека, так и его синтетических пептидных фрагментов [2–4]. Было показано, что антигенный B-эпитоп IL-2 человека, расположенный в районе 59–72 последовательности белка, является доминантным [3] и его пространственная организация в комплексе со специфическим антителом была подробно изучена [4, 5]. Кроме того, была изучена функциональная активность серии модифицированных пептидов (I)–(VI) (схема 1) – фрагментов последовательности 59–72 IL-2, по отношению к нескольким видам клеток иммунной системы (моноклеарным клеткам, естественным киллерам, макрофагам).

Оказалось, что пептиды (I)–(III), в особенности пептид (I), изменяют характер и динамику реакции макрофагов на такие “классические стиму-

лы” иммунного ответа, как липополисахарид (LPS), 4- β -форбол-12- β -миристинат-13- α -ацетат (РМА) [6], или дипептид бестатин [7] (у остальных пептидов (IV)–(VI) подобная активность не обнаружена) [2]. Известно, что LPS, РМА и бестатин стимулируют повышенную цитотоксичность макрофагов в отношении чужеродных микроорганизмов и собственных поврежденных клеток, а также активный воспалительный ответ с продукцией ряда провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-18 и др.) [8]. Пептиды (I)–(III), в отличие от LPS, РМА и бестатина, не только не ин-

дуцировали у предварительно нестимулированных макрофагов существенной цитотоксической реакции, но вызывали у них хотя и слабую, кратковременную, но достоверную ростстимулирующую активность по отношению к клеткам-мишеням [2]. Однако, после предварительной активации макрофагов с помощью РМА или LPS пептиды (I)–(III) подавляли их цитотоксическую активность по отношению к клеткам-мишеням (клетки миеломы мышей Р3х63-Ао8 или эритромиелоидная линия клеток К-562) и, напротив, стимулировали пролиферацию клеток Р3х63-Ао8 и К-562 [2].

59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72

Ac-Leu-Glu-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (I)

Ac-Glu-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (II)

Ac-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (III)

Ac-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (IV)

Ac-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (V)

Ac-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (VI)

Схема 1.

Между активностью пептидов *in vitro* и *in vivo* наблюдалась выраженная корреляция: пептиды (I)–(III), активные *in vitro*, проявили способность к восстановлению функции печени после ее токсического повреждения [2]. В некоторых экспериментах самый активный пептид (I) восстанавливал детоксикационную функцию печени практически до нормального уровня (см. ниже). Кроме того, он стимулировал заживление кожных ран [2] и ангиогенез [9].

Целью данной работы является более детальное исследование обнаруженной нами функциональной активности пептидов (I)–(III) (особенно *in vivo*) и выяснение механизма действия пептидов на основе дополнительных экспериментов и современных литературных данных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В экспериментах *in vitro* пептиды (I)–(III) проявляли способность усиливать ростстимулирующую активность предварительно активированных макрофагов [2]. Мы предположили, что в экспериментах по регенерации печени и кожи *in vivo* регенеративно-репаративный эффект этих пептидов также опосредован их действием на предварительно активированные макрофаги.

Чтобы проверить это предположение, мы провели новую серию экспериментов на моделях токсического повреждения печени под действием СС₁₄ или галактозамина с использованием самого

активного пептида (I). Полученные результаты свидетельствовали в пользу того, что гепатозащитное действие пептида также осуществлялось путем его воздействия на перитонеальные макрофаги мыши и человека, поскольку культуральная среда, полученная от этих макрофагов после обработки пептидом (I) и центрифугирования, обладала таким же гепатозащитным действием, как и сам пептид (см. табл. 1).

Для анализа гепатопротекторного действия пептида (I) изучали также его влияние на активность известных гепатоспецифических ферментов: аланинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.2), γ -глутамилтрансферазы (КФ 2.6.1.23) и щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) (табл. 2). В ходе трехдневного лечебного применения пептида (I) после токсического повреждения печени СС₁₄ или галактозамином уровень содержания всех этих ферментов в сыворотке крови экспериментальных животных существенно снижался по сравнению с контролем (интактными животными), что указывает на сохранение целостности мембран гепатоцитов, т.е. на выраженный гепатопротекторный эффект пептида (I).

Сравнение эффектов бестатина, пептида (I) и преднизолона на гепатоциты демонстрирует принципиальную их разницу. Бестатин, как индуктор цитотоксической активности макрофагов [7], не оказывал репаративного действия на гепатоциты, в то время как преднизолон (известное противовоспалительное средство) проявлял ре-

Таблица 1. Влияние супернатантов макрофагов, обработанных *in vitro* пептидом (I), на длительность тиопенталового наркоза у мышей с острым токсическим гепатитом, индуцированным тетрахлорметаном или галактозамином

Группы животных	Продолжительность тиопенталового наркоза, мин		
Интактные мыши	3.6 ± 0.9		
Мыши после введения гепатотоксина	Тетрахлорметан		Галактозамин
	53.2 ± 6.9		52.3 ± 6.7
Мыши после введения гепатотоксина и супернатанта резидентных макрофагов	40.5 ± 2.7		53.3 ± 8.3
Мыши после введения гепатотоксина и супернатанта макрофагов, обработанных пептидом (I) в дозе 0.1 мкг/мл	Превентивное введение	Лечебное введение	Лечебное введение
	23.6 ± 2.6*	19.1 ± 1.8*	20.6 ± 4.2*
Мыши после введения гепатотоксина и супернатанта макрофагов, обработанных пептидом (I) в дозе 1.0 мкг/мл	11.8 ± 1.9*	6.1 ± 0.7*	9.7 ± 1.3*

Эксперимент проводили аналогично описанному в работе [2].

Острый гепатит индуцировали однократным подкожным введением тетрахлорметана в дозе 5 мл/кг веса в 50% растворе в оливковом масле или двукратным пероральным введением галактозамина в дозе 1 г/кг веса. Получение перитонеальных макрофагов и условия их обработки *in vitro* пептидом (I) описаны ранее [2, 21]. Супернатанты (200 мкл/мышь) вводили мышам внутривенно.

$p < 0.05$ по сравнению с группой мышей после введения гепатотоксина. Количество животных в каждой группе – не менее 12.

Таблица 2. Влияние пептида (I) на активность гепатоспецифических ферментов у мышей с острым токсическим гепатитом, вызванным тетрахлорметаном

Показатель	Интактные животные	После введения тетрахлорметана			
		Контрольные животные	Мыши, получавшие пептид (I)	Мыши, получавшие бестатин	Мыши, получавшие преднизолон
Аланинамино-трансфераза, Ед. акт./л	29.6 ± 0.8	48.5 ± 4.9*	36.6 ± 2.9**↓	60.7 ± 7.1**↑	35.4 ± 2.8**↓
Щелочная фосфатаза, Ед. акт./л	16.1 ± 3.6	38.8 ± 5.3*	20.4 ± 3.1**↓	32.6 ± 3.8*	29.5 ± 5.6*
γ-Глутамилтрансаминаза, Ед. акт./л	19.8 ± 4.0	55.1 ± 7.7*	24.8 ± 5.8**↓	55.3 ± 7.5*	37.5 ± 5.3**↓

Тетрахлорметан вводили однократно подкожно в дозе 7.5 мл/кг в виде 50% раствора в оливковом масле. В качестве контрольных использовали животных после введения тетрахлорметана. Активность ферментов определяли колориметрически на биохимическом анализаторе Ехргеп-550 с использованием стандартных коммерческих наборов Сiba Сoring. Стрелками отмечено увеличение или уменьшение уровня гепатоспецифических ферментов по сравнению с контролем.

* Отличия от интактных животных достоверны, $p < 0.05$.

** Отличия от контрольных животных достоверны, $p < 0.05$.

паративный эффект аналогичный эффекту пептида (I), хотя и менее выраженный (табл. 2).

Известно, что бестатин, эфиры форбола и липополисахариды индуцируют у макрофагов состояние, близкое к классической активации [8].

Активированные макрофаги вызывают активную воспалительную реакцию, продуцируя провоспалительные цитокины (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-18, и др.) и активные формы кислорода и азота, токсичные для микробов, и проявляют способность к фагоцитозу [10–12].

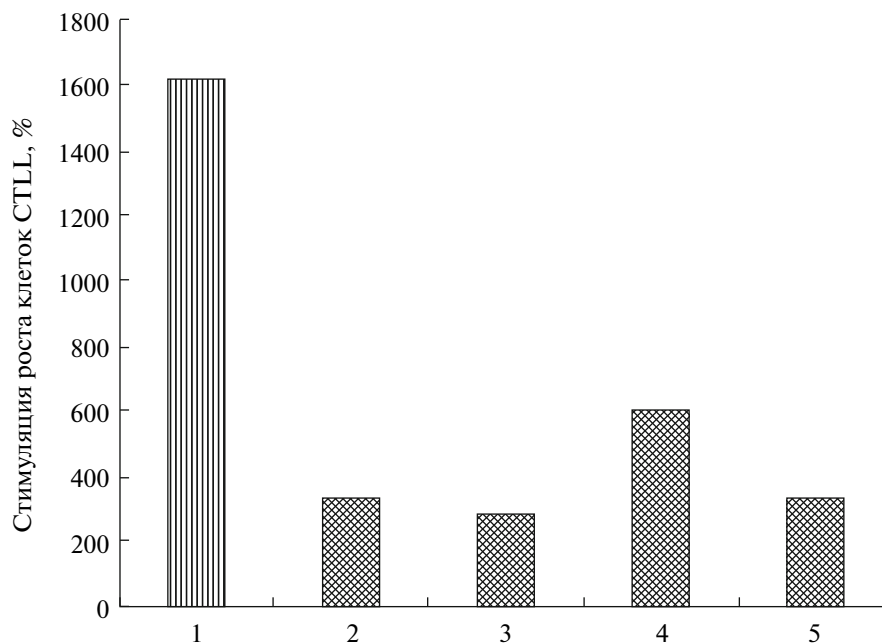


Рис. 1. Влияние пептида (I) в концентрации 1.6 (2), 8 (3), 40 (4) и 200 мкг/мл (5) на рост IL-2-зависимой клеточной линии СТЛЛ (10^5 клеток в одну лунку), предварительно инкубированной без IL-2 в течение 24 ч. Положительный контроль (1) – рост клеточной линии в присутствии IL-2 в концентрации 500 ед. акт/мл (0.05 мкг/мл). * Различия с контролем (СТЛЛ в среде RPMI/10% FCS без IL-2 и пептида (I)) достоверны, $p < 0.05$.

Мы предполагаем, что пептиды (I)–(III) являются модификаторами активности макрофагов и, скорее всего, они подавляют их классическую активацию и вызывают у них состояние, близкое к так называемой “альтернативной” активации [10–12]. Альтернативно активированные макрофаги участвуют в процессах роста клеток, продукции коллагена, создания внеклеточного матрикса, ангиогенеза и репарации тканей [10, 11]. Очевидно, что гепатопротекторный эффект, стимуляция заживления ран и ангиогенез, проявляемые пептидами (I)–(III), – это свойства, характерные именно для альтернативной активации макрофагов.

Так как пептиды (I)–(III) являются фрагментами последовательности IL-2 человека, следовало определить, связаны ли их биологические эффекты с IL-2-рецепторным взаимодействием. Высоко-аффинный рецептор IL-2 – это мембранный гетеротримерный белковый комплекс, состоящий из специфичной α -субъединицы (IL-2R α , p55, или CD25), β -субъединицы (IL-2R β , p75, или CD122), общей для IL-2 и IL-15, и γ -субъединицы (γ_c , p65, или CD132), общей для многих цитокинов, в том числе для IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21 [13–15]. Первоначально рецепторы IL-2 (IL-2R) были обнаружены у субпопуляции CD4⁺ Т-хелперных лимфоцитов, но в дальнейшем было показано, что они присутствуют и на других субпопуляциях Т-лимфоцитов, на мононуклеарных клетках крови, моноцитах, макрофагах и НК-клетках [16]. Помимо мембрано-

связанной формы IL-2R α , лимфоциты, моноциты и макрофаги могут продуцировать растворимую форму IL-2R α , которая обнаруживается в цитоплазме [16] и способна захватывать, связывать и транспортировать IL-2 к мембране клеток, где в связанной форме присутствуют две другие субъединицы IL-2R. Именно взаимодействие IL-2 с трехсубъединичным рецепторным комплексом приводит к полноценному физиологическому ответу *in vivo*.

Весьма вероятно, что эффект синтетических пептидов (I)–(III) на макрофаги осуществляется через их взаимодействие с α -субъединицей рецептора IL-2, так как согласно данным рентгеноструктурного анализа [13], во взаимодействие IL-2 с IL-2R α вовлечены следующие гидрофильные и гидрофильные аминокислотные остатки: Phe42, Phe44, Tyr45, **Pro65**, **Leu72**, **Glu61**, **Glu62**, Lys35, Arg38 и Lys43. Гидрофильные аминокислотные остатки IL-2 образуют ионные пары с соответствующими остатками IL-2R α на периферии: **Glu61**/Lys38, **Glu62**/Arg36, Lys35/Glu1, Arg38/Asp6, Lys43/Glu29, в то время как остатки IL-2R α Leu2, Met25, Leu42 и Tyr43 гидрофобно взаимодействуют с Phe42, Phe44, Tyr45, **Pro65** и **Leu72** IL-2 в центральной части комплекса IL-2/IL-2R α [13]. При связывании с IL-2R α пространственная структура участка 61-72 IL-2 представляет собой α -спираль [13].

Наши экспериментальные результаты хорошо согласуются с литературными данными. Во-первых, 4 из 10 аминокислотных остатков, взаимо-

действующих с IL-2R α (выделены жирным шрифтом), входят в состав синтезированного нами пептида (I). Во-вторых, пептиды по их эффекту на убывание ростстимулирующей и гепатопротекторной активности макрофагов можно расположить в ряд: (I) > (II) > (III), а остальные пептиды (IV), (V) и (VI) совершенно неактивны [2]. Это можно объяснить тем обстоятельством, что в последовательностях пептидов (IV)–(VI) отсутствуют остатки Glu61 и Glu62, которые непосредственно взаимодействуют с IL-2R α . В-третьих, ранее нами и другими авторами было показано методами ЯМР и рентгеноструктурного анализа, что пептид последовательности 66–72 IL-2 человека в комплексе со специфичным к нему и к IL-2 моноклональным антителом имеет α -спиральную конформацию [4, 5]. Учитывая, что этот участок молекулы IL-2 не претерпевает конформационных изменений при связывании с IL-2R [13], можно предположить, что пептид (I) принимает α -спиральную конформацию не только в комплексе со специфичным антителом, но и при взаимодействии с IL-2R α .

Нашу гипотезу о связывании пептида (I) с IL-2R α подтверждают и эксперименты с использованием клеточной линии CTLL, которая постоянно экспрессирует IL-2R и сохраняет жизнеспособность только в присутствии IL-2 [17]. Пептид (I) в диапазоне концентраций 1.6–200 мкг/мл сти-

мулировал рост клеток CTLL, предварительно инкубированных без IL-2 в течение 24 ч (рис. 1). При этом эффект пептида (I) в оптимальной концентрации (40 мкг/мл) был в 2.7 раза слабее, чем действие самого IL-2 (0.05 мкг/мл). Кроме того, предварительная или одновременная инкубация клеток CTLL с пептидом (I) приводила к уменьшению дозы IL-2, необходимой для стимуляции пролиферации этих клеток до величины, составляющей половину от их максимально возможной пролиферации (рис. 2).

Мы также провели эксперименты по связыванию пептида (I) с клетками CTLL, для чего из немеченного предшественника (VII) [2] был синтезирован ^3H -меченный пептид (VIII) (схема 2). Если предположить, что это связывание специфично (что подтверждают вышеописанные эксперименты, см рис. 1 и 2) и происходит именно с IL-2R α , то можно условно рассчитать константу связывания пептида (I) с IL-2R α . В наших экспериментах она составляла 1.41×10^{-6} М, что приблизительно на порядок отличается от K_d пары IL-2–IL-2R α (10^{-7} М). Сравнивая эти величины, следует принять во внимание, что пептид (I) представляет собой только один фрагмент довольно протяженного сайта связывания IL-2 с IL-2R α , а его молекулярная масса более чем в 8 раз уступает массе IL-2.

Вос-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (VII)

↓TFA/AcOH (7 : 3)

TFA•H-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe

↓ ^3H Ac $_2$ O (10 экв.), N-метилморфолин (4 экв.)

^3H Ac-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe

↓H $_2$, Pd/C, циклогексадиен (60 экв.)

↓гель-проникающая хроматография на Тоуо Pearl HW-40

^3H Ac-Leu-Glu-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (VIII) (7.3 Ки/ммоль, 270 ГБк/ммоль)

Схема 2. Синтез ^3H -меченного пептида (VIII).

Вероятно, активность пептидов (I)–(III) по отношению к макрофагам также связана с их взаимодействием с IL-2R. Однако, взаимодействие IL-2 со специфическим рецептором на макрофагах может по-разному активировать эти клетки, вызывая у них как IL-2-подобную, так и IL-2-антагонистическую активность, в зависимости от микроокружения и конкретной биологической ситуации [18–20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основе всех вышеприведенных данных можно сделать следующие выводы:

– регенеративно-репаративные свойства пептидов (I)–(III) реализуются через их воздействие на макрофаги;

– под действием пептидов (I)–(III) тип активации макрофагов меняется от классической к альтернативной;

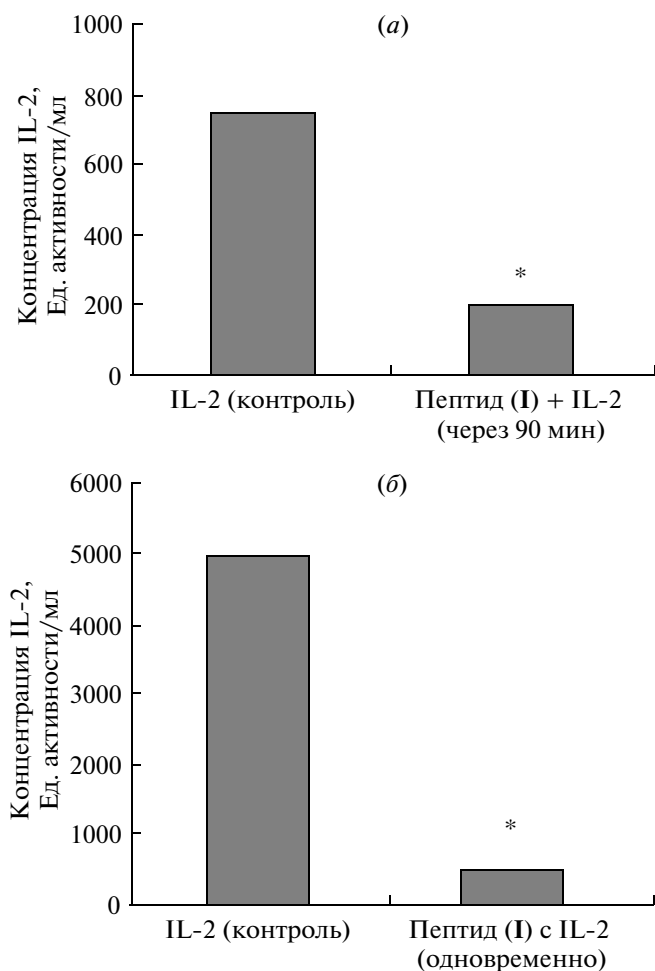


Рис. 2. Уменьшение концентрации IL-2, необходимой для стимуляции пролиферации клеток СТЛЛ (10^4 клеток в лунке) до величины, составляющей половину от максимального значения, под влиянием пептида (I) при его предварительной (а) или одновременной (б) инкубации с IL-2. Отличия от контроля (роста клеток СТЛЛ в присутствии только IL-2) достоверны, $p < 0.05$.

– воздействие пептидов (I)–(III) на макрофаги с высокой степенью вероятности связано с их взаимодействием с α -субъединицей рецептора IL-2.

Современные данные характеризуют макрофаг не только как фагоцитарную и эффекторную клетку, но, в основном, как один из ключевых факторов гомеостаза [10, 11, 19]. Поразительная пластичность макрофагов в зависимости от конкретного органа или ткани и их микроокружения и состояния приводит к быстрому и очень значительному изменению их физиологических свойств. Поэтому модуляция активности макрофагов открывает новые возможности воздействия на многие патологические процессы, связанные с нарушениями активации макрофагов, включая аутоиммунные и сердечно-сосудистые заболева-

ния, опухоли, диабет, ожирение и др. [11]. В этой связи обнаруженная у пептидов (I)–(III) активность также может иметь терапевтическое значение для временного подавления воспалительной и цитотоксической реакции макрофагов, особенно учитывая инертность исследованных пептидов по отношению к макрофагам, не находящимся в состоянии классической активации.

Несмотря на детальное установление структуры комплекса IL-2 с IL-2R [13, 14], многие аспекты влияния IL-2 на клетки-мишени, особенно на макрофаги, остаются невыясненными. В этой связи, пептидные фрагменты IL-2, проявляющие активность по отношению к макрофагам, могут послужить важным инструментом для исследования их взаимодействия с этим цитокином.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для биологических тестов использовали липополисахарид (“Мосхимпрепарат”, Россия), РМА, бестатин, галактозамин, среды Игла, Хэнкса и RPMI-1640, телячью эмбриональную сыворотку (FCS), антибиотики (Sigma, США) и планшеты и чашки Петри для иммунологических реакций (Nunc, Дания).

Перитонеальные макрофаги получали у мышей линии ВСДГ, свободных от специфических патогенов (виварий Центрального института микробиологии и эпидемиологии, Иена, Германия), как описано в работе [21]. Синтез, очистка и характеристика пептидов описаны в работе [2].

Влияние пептидов на восстановление функции печени после ее токсического повреждения изучали на белых мышах-самцах линии НР, массой 18–20 г, как описано в работе [2]. **Активность ферментов** определяли колориметрически на биохимическом анализаторе Expre-550 с использованием стандартных наборов (Ciba Corning, Германия).

Влияние пептида (I) на рост клеточной линии СТЛЛ. Клетки СТЛЛ (10^6 клеток/мл) трижды промывали бессывороточной средой RPMI и инкубировали 24 ч в среде RPMI с 5% FCS, чтобы минимизировать эффект эндогенного IL-2. Затем клетки в RPMI/10% FCS помещали в 96-луночные планшеты (10^5 клеток в лунку) и инкубировали 20 ч при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в присутствии пептида (I) в диапазоне концентраций 1.6–200 мкг/мл (200 мкл в лунку) или IL-2 (Институт органического синтеза, Латвия, удельная активность – 10^4 ед./мл) в концентрации 500 ед. акт./мл*, или 0.05 мкг/мл (200 мкл в лунку). В каждую лунку прибавляли [^{14}C]тимидин (0.3 мкКи). Через 4 ч

* За единицу активности IL-2 принято его количество, выделенное в течение 24 ч в 1 мл клеточной культуры СТЛЛ (1×10^6 клеток/мл) после стимуляции конканавалином А (5 мкг/мл).

клетки собирали харвестером на GC/C-фильтры (Whatman, England) и определяли количество включенного [¹⁴C]тимидина с помощью счетчика Delta-300 (Nuclear, США). Каждое определение проводили в четырех повторах. Стимуляцию роста клеток CTLL рассчитывали по формуле:

[(радиоактивность в экспериментальном образце – радиоактивность в контрольном образце) / радиоактивность в контрольном образце] × 100%. В качестве контроля использовал клетки CTLL, культивированные в среде RPMI с добавкой 10% FCS.

Кооперативное влияние пептида (I) и IL-2 на рост клеток CTLL. Клетки CTLL (10⁴ клеток на лунку) инкубировали с пептидом (I) (1 мкг/мл, 100 мкл на лунку) 90 мин при 37°C, промывали трижды для удаления избытка пептида и далее инкубировали с IL-2 (100 мкл на лунку, в диапазоне концентраций, указанном на рис. 2, и через 24 ч в каждую лунку добавляли [³H]тимидин (0.04 МБк). Пролиферацию клеток определяли после 24-часовой инкубации по величине включенного в клетки [³H]тимидина (рис. 2а). Аналогичный эксперимент проводили при одновременной инкубации клеток CTLL с IL-2 и пептидом (I) (рис. 2б).

Связывание пептида (I) с клетками CTLL. ³H-Меченный пептид (VIII) получали ацетилированием [³H]уксусным ангидридом (7.3 Ки/ммоль, 270 ГБк/ммоль; Amersham LIFE SCIENCE, Англия) соответствующего защищенного 14-членного пептида (VII) с последующими стадиями деблокирования и очистки, аналогичными описанным в синтезе пептида (I) [2]. Клетки CTLL были предварительно промыты и обработаны, как описано выше. ³H-Меченный пептид в физиологическом растворе (40 мкг/мл, 200 мкл в лунку) добавляли к клеткам CTLL (40 × 10⁶ клеток в 1 мл среды RPMI-1640, охлажденной до 0°C, 200 мкл/лунку) и инкубировали 20 мин при 0°C. Клетки три раза промывали в среде RPMI-1640, центрифугировали, добавляли диоксаноый сцинтиллятор, и измеряли радиоактивность в образцах клеток.

Для математической обработки экспериментальных данных использовали общепринятые методы параметрической и непараметрической статистики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Malik T.R., Castro I. // *Immunity*. 2010. V. 33. № 12. P. 153–165.
2. Оноприенко Л.В., Михалева И.И., Иванов В.Т., Войтенков Б.О., Окулов В.Б. // *Биоорганическая химия*. 1996. Т. 22. № 3. С. 180–190.
3. Оноприенко Л.В., Михалева И.И., Лунев В.Е., Несмеянов В.А., Иванов В.Т. // *Биоорганическая химия*. 1989. Т. 15. № 7. С. 908–921.
4. Балашова Т.А., Пашков В.С., Нольде Д.Е., Оноприенко Л.В., Михалева И.И., Самохвалова Л.В., Малахова Г.В., Арсеньев А.С. // *Биоорганическая химия*. 1993. Т. 19. № 1. С. 21–32.
5. Afonin P.V., Fokin A.V., Tsygannik I.N., Mikhailova I.Y., Onoprienko L.V., Mikhaleva I.I., Ivanov V.T., Mareeva T.Y., Nesmeyanov V.A., Pangborn W.A., Duax W.L., Pletnev V.Z. // *Protein Sci.* 2001. V. 10. № 8. P. 1514–1521.
6. Chang T., Kim Y.B. // *J. Leukoc. Biol.* 1988. V. 44. P. 329–336.
7. Schorlemmer H.U., Bosslet K., Sedlacek H.H. // *Cancer Res.* 1983. V. 43. P. 4148–4153.
8. Sweet M.J., Hume D.A. // *J. Leukoc. Biol.* 1996. V. 60. P. 8–26.
9. Ушморков А.Г., Оноприенко Л.В., Войтенков Б.О., Михалева И.И. // *Вопросы онкологии*. 1991. Т. 37. № 6–7. С. 826–830.
10. Оноприенко Л.В. // *Биоорганическая химия*. 2011. Т. 37. № 4. С. 1–15; Оноприенко Л. // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2011. V. 37. № 4. P. 387–399.
11. Ma J., Chen T., Mandelin J., Ceronis A., Miller N.E., Hukkanen M., Ma J.F., Kottinen Y.T. // *Cell Mol. Life Sci.* 2003. V. 60. P. 2334–2413.
12. Mosser D.M., Edwards J.P. // *Nature Reviews/Immunology*. 2008. V. 8. P. 958–969.
13. Stauber D.J., Debler E.W., Horton P.A., Smith K.A., Wilson I.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 2006. V. 103. № 8. P. 2788–2793.
14. Arkin M.R., Randal M., DeLano W.L., Hyde J., Luong T.N., Oslob J.D., Raphael R., Taylor L., Wang J., McDowell R.S., Wells J.A., Braisted A.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 2003. V. 100. № 4. P. 1603–1608.
15. Rickert M., Wang X., Boulanger M.J., Goriatcheva N., Garsia K.C. // *Science*. 2005. V. 308. P. 1477–1480.
16. Hodge S., Hodge G., Flower R., Han P. // *Scand. J. Immunol.* 2000. V. 51. P. 67–72.
17. Weston L., Clezy A., Farrell C. // *Immunology and Cell Biology*. V. 76. P. 190–192.
18. Tossi Z., Sedor J.R., Lapurga J.P., Ondash R.J., Ellner J.J. // *J. Clin. Invest.* 1990. V. 85. № 6. P. 1777–1784.
19. Bachmann M.F., Oxenius A. // *EMBO Reports*. 2007. V. 8. № 12. P. 1142–1148.
20. Puddi P., Carollo M., Pietraforte I., Spadaro F., Tombesi M., Ramoni C., Belardelli F., Gessani S. // *J. Leukoc. Biol.* 2005. V. 78. № 3. P. 686–695.
21. Okulov V.B., Voytenkov B.O., Ushmorov A.G., Polischuk N.D., Gromov S.A. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1992. V. 118. № 7. P. 537–541.

IL-2-Receptor Associated Action of the Modified Peptide Fragments of Human IL-2 on Macrophages

L. V. Onoprienko*., I. I. Mikhaleva*, B. O. Voytenkov**, and V. T. Ivanov*

#Phone: +7 (495) 335-53-66; e-mail: onolv@mail.ru

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

**OOO Research Center “Komkon”, St. Petersburg

Synthetic peptides corresponding to the 59–72 (I), 60–72 (II) and 61–72 (III) sequences of human interleukin 2 with their N^α acetylated and C^α methylated termini were shown to exhibit pronounced hepatoprotective properties. These peptides neutralized hepatotoxic effects of such agents as tetrachloromethane and galactosamine in experiments *in vivo*. The peptide action revealed as normalization of duration of the thiopental narcosis of experimental animals and the level of hepatospecific enzymes in their blood. The effects of peptides (I)–(III) proved to be similar to that of prednisolone (the well-known anti-inflammatory agent), whereas the bestatine cytotoxic dipeptide had no hepatoprotecting effect. The target of the hepatoprotective activity of the peptides was shown to be the preliminary activated macrophages. We proposed that this activity of the peptides was associated with their interaction with the α-subunit of the interleukin 2 receptor (IL-2R_α), because the X-Ray analysis pointed to this region as one of binding sites of IL-2 with IL-2R_α. Experiments on the influence of the most active (59–72)-peptide on growth of the IL-2 dependent cell line (CTLL) confirmed this proposal. The ³H-labeled peptide corresponding to the 59–72 sequence of the human IL-2 was shown to bind to the CTLL cells.

We assumed that the binding of this peptide was specific and occurred precisely with IL-2R_α and virtually determined the binding constant. Its value (1.41×10^{-6} M) was comparable with that of the interaction of IL-2 with IL-2R_α (approximately 10^{-7} M).

Keywords: synthetic peptides, interleukin 2, receptor of interleukin 2, α-subunit of the interleukin 2 receptor.