



УДК 577.112.384.4.017

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ *L*-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ С Т-ЛИМФОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА

© 1997 г. И. А. Костянян, Е. В. Наволоцкая*,
Р. И. Нуриева**, В. П. Завьялов*, В. М. Липкин#

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/110;

*Институт инженерной иммунологии,
пос. Любучаны Московской области;

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

Поступила в редакцию 04.03.97 г. Принята к печати 28.04.97 г.

Обнаружено и охарактеризовано специфическое взаимодействие [^3H]Glu с Т-лимфоцитами, выделенными из крови здоровых доноров, $K_d = 0.236$ мкМ. Установлено, что немеченый структурный аналог *L*-глутаминовой кислоты квискалат и немеченые дипептиды Ala-Glu, Glu-Ala, Glu-Glu конкурентно ингибируют специфическое связывание [^3H]Glu с Т-лимфоцитами (с K_i 0.19, 2.4, 3.4 и 1.2 мкМ соответственно). С помощью конъюгатов меченой и немеченой глутаминовой кислоты с декстраном показано, что рецепторы [^3H]Glu локализованы на внешней стороне плазматической мембраны Т-лимфоцитов.

Ключевые слова: *L*-глутаминовая кислота, Т-лимфоцит, глутаминовые рецепторы, иммунная система.

Известно, что *L*-глутаминовая кислота выполняет ряд важнейших функций в центральной нервной системе (ЦНС): она является основным медиатором возбуждения, обеспечивая химическую передачу электрического сигнала в синапсах, непосредственно участвует в формировании памяти [1, 2], в эмбриогенезе, регулирует рост и развитие нейронов [3]. Действие глутаминовой кислоты в ЦНС опосредовано глутаминовыми рецепторами различных типов (GluRs), которые традиционно подразделяют на ионотропные, формирующие лиганд-воротные ионные каналы [4, 5], и метаболитные – индуцирующие изменения метаболических процессов внутри нейронов с участием G-белков [6, 7].

Исследования последних лет свидетельствуют о прямом участии *L*-глутаминовой кислоты и GluRs в функционировании эндокринной и иммунной систем. Так, была обнаружена способность *L*-глутаминовой кислоты и ряда ее структурных аналогов стимулировать секрецию инсулина β -клетками поджелудочной железы крысы

[8, 9]. Одновременно было показано существование на поверхности β -клеток и клеток островков Лангерганса специфических глутаминовых рецепторов, близких по своим характеристикам к ионотропным GluRs в ЦНС [9].

Многолетние наблюдения клиницистов указывают на корреляцию между уровнем *L*-глутаминовой кислоты в плазме и индивидуальной реактивностью лимфоцитов у здоровых доноров и опухолевых пациентов. Ее физиологическая концентрация в плазме человека и мыши колеблется от 40 до 90 мкМ, при наличии в организме опухоли эта величина в 3–4 раза выше. Отмечено, что хроническое действие повышенных концентраций этой аминокислоты у опухолевых больных (в течение нескольких месяцев и лет) приводит к снижению числа лимфоцитов и их реактивности [10].

Недавно было показано, что возрастающие концентрации внеклеточной *L*-глутаминовой кислоты подавляют синтез ДНК в культуре митогенстимулированных лимфоцитов: увеличение ее концентрации в 4 раза приводило к снижению включения [^3H]тимидина в клетки на 30–40%. Среди изученных в этом тесте агонистов глутаминовых рецепторов мозга наиболее сильное ингибирование пролиферации вызывала квискалинная кислота (квискалат), среднее по величине ингибирование – *N*-метил-*D*-аспарагиновая кислота и кайнат (2-карбоксит-3-карбоксиметил-4-

Сокращения: ЦНС – центральная нервная система, GluRs – глутаминовые рецепторы. В аббревиатуре *L*-аминокислот символ *L* опущен.

Автор для переписки (тел.: (095) 336-61-66, факс: (095) 330-70-10, e-mail: Lipkin@ibch.siobc.ras.ru).

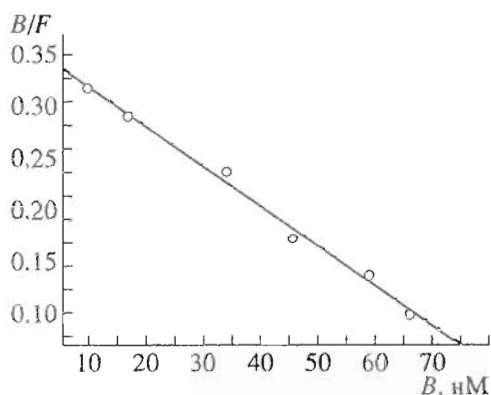


Рис. 1. Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания [^3H]Glu с Т-лимфоцитами из крови здоровых доноров. B и F – молярные концентрации специфически связавшейся (B) и свободной (F) [^3H]Glu.

изопропенилпирролидин) [11]. На основании полученных результатов авторы высказали предположение, что лимфоциты в норме имеют глутаминовые рецепторы, подобные GluRs ЦНС.

В настоящей работе мы изучили взаимодействие [^3H]Glu с Т-лимфоцитами, выделенными из крови здоровых доноров. В результате были обнаружены и охарактеризованы специфические глутаматсвязывающие участки, локализованные на внешней поверхности клеточной мембраны Т-лимфоцитов. Специфичность связывания продемонстрирована в экспериментах с использованием в качестве потенциальных конкурентов [^3H]Glu немеченых аминокислот и синтетических пептидов различной длины и структуры.

Наличие на Т-лимфоцитах человека глутаматсвязывающих участков было показано методом радиолигандного анализа с использованием в качестве меченого лиганда [^3H]Glu (рис. 1). График Скэтчарда представляет собой прямую линию, что свидетельствует о наличии рецепторов одно-

Результаты ингибирования специфического связывания [^3H]Glu (250 нМ) с Т-лимфоцитами человека (значения \pm SEM из тех независимых экспериментов)

Лиганд*	IC_{50} , мкМ	K_i , мкМ
Квискалат	0.40 ± 0.02	0.19 ± 0.01
Gly	>100	>100
Lys	>100	>100
Ala-Glu	5.0 ± 0.1	2.4 ± 0.1
Glu-Ala	7.0 ± 0.1	3.4 ± 0.1
Glu-Glu	2.5 ± 0.1	1.2 ± 0.1

* Для остальных пептидов, изученных в этом тесте (FY, KGI FY, VKIDFY, VKNFY, LKEKK YSP, LKIEDYUICEVEDQKEE, LKKEKKEV), величины IC_{50} и K_i превышали 100 мкМ.

го класса с K_d 0.236 мкМ. Неспецифическое связывание [^3H]Glu изучали в присутствии 10^{-3} немеченой L-глутаминовой кислоты. Его величина составляла $7.8 \pm 0.5\%$ величины общего связывания [^3H]Glu с клетками.

Для оценки специфичности идентифицированных рецепторов была проведена серия экспериментов по ингибированию связывания [^3H]Glu потенциальными конкурентами – квискалатом, аминокислотами и синтетическими пептидами. Результаты экспериментов, суммированные в таблице, свидетельствуют о том, что способностью ингибировать специфическое связывание [^3H]Glu с Т-лимфоцитами обладали (K_i , мкМ) квискалат (0.19) и дипептиды Ala-Glu (2.4), Glu-Ala (3.4) и Glu-Glu (1.2). Соответствующие кривые ингибирования приведены на рис. 2. Остальные синтетические пептиды, в том числе 17-членный пептид, содержащий пять остатков Glu и два остатка Gln, в диапазоне концентраций 10^{-10} – 10^{-5} М не ингибировали связывание.

Таким образом, максимальным сродством к рецепторам обладали [^3H]Glu и квискалат. L-Глутаминовая кислота в составе пептидов частично или полностью теряла способность к специфическому связыванию с рецепторами Т-клеток.

Для доказательства локализации идентифицированных глутаминовых рецепторов на внешней поверхности клеточной мембраны Т-лимфоцитов были получены объемные конъюгаты меченой и немеченой L-глутаминовой кислоты с декстраном. Сравнительный анализ специфического связывания с клетками свободной и конъюгированной [^3H]Glu показал, что глутаматсвязывающие сайты локализованы на внешней стороне плазматической мембраны.

Мы предприняли попытку ответить на вопрос о природе выявленных глутаминовых рецепторов Т-лимфоцитов. Для этой цели клетки обрабатывали трипсином до проведения реакции связывания (см. “Экспериментальную часть”). В результате они теряли способность специфически связывать [^3H]Glu, что свидетельствует в пользу белковой природы участков, связывающих L-глутаминовую кислоту.

В дальнейшем мы планируем провести детальную физико-химическую характеристику глутаминовых рецепторов Т-лимфоцитов и оценить степень их родства с квискалатчувствительными GluRs мозга и поджелудочной железы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали L-[6- ^3H]Glu с удельной активностью 56 Ки/ммоль (Amersham, Англия); немеченые L-аминокислоты, квискалиновую кислоту (β -[3,5-диокси-1,2,4-оксадиазолидин-2-ил]-L-аланин), трипсин, питательные среды, фетальную

сыворотку телянка (Sigma, США); N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновую кислоту) (HEPES; Fluka, США); декстран 500 (Pharmacia, Швеция); азид натрия (NaN_3) (Serva, Германия); жидкий сцинтиллятор Ready Gel (Beckman, США). Остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

Пептиды были синтезированы ранее методом пентафторфениловых эфиров N-замещенных аминокислот [12]. Чистота пептидов после очистки ВЭЖХ превышала 95%. Молекулярную массу пептидов определяли масс-спектрометрическим методом с ионизацией бомбардировкой ускоренными атомами.

Получение Т-лимфоцитов. Мононуклеарные клетки из крови здоровых доноров выделяли по методу [13]. Суспензию лимфоцитов разделяли на прилипающую и не прилипающую к подложке фракции на колонке с нейлоновой ватой [14]. Неприлипающую фракцию элюировали средой RPMI-1640, содержащей 5% инактивированной фетальной сыворотки телянка. Полученная фракция содержала Т-лимфоциты и небольшое количество (менее 1%) моноцитов и В-лимфоцитов.

Реакцию связывания ^3H Glu с Т-лимфоцитами проводили в соответствии со следующей схемой: клетки (10^6 /проба) инкубировали 1 ч при 4°C с ^3H Glu (концентрационный диапазон 10^{-5} – 10^{-10} М) в 1 мл RPMI-1640 (без аминокислот), содержащей 20 мМ NaN_3 и 10 мМ HEPES, pH 7.5. Затем реакционную смесь из каждой пробирки фильтровали через отдельный стекловолокнистый фильтр GF/B (Whatman, Англия). Радиоактивность на фильтрах подсчитывали с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика (Rack-Beta LKB-Wallis, Швеция). Результаты анализировали по методу Скэтчарда [15]. Величину неспецифического связывания ^3H Glu с клетками определяли в присутствии 10^{-3} М немеченой L-глутаминовой кислоты.

Для оценки способности квискалата, аминокислот и пептидов (структура использованных немеченых лигандов приведена в таблице) ингибировать специфическое связывание меченой L-глутаминовой кислоты Т-лимфоциты (10^6 клеток/проба) инкубировали с ^3H Glu (2.5×10^{-7} М) и немеченым лигандом (концентрационный диапазон 10^{-10} – 10^{-5} М), как описано выше. Константу ингибирования (K_i) определили по формуле $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + [L]/K_d)$ [16], где $[L]$ – молярная концентрация ^3H Glu; K_d – константа диссоциации комплекса ^3H Glu – рецептор; IC_{50} – концентрация немеченого лиганда, вызывающая 50% ингибирование специфического связывания ^3H Glu. Величину IC_{50} определяли графически на основании кривой ингибирования (рис. 2). Значение K_d определяли предварительно как описано выше.

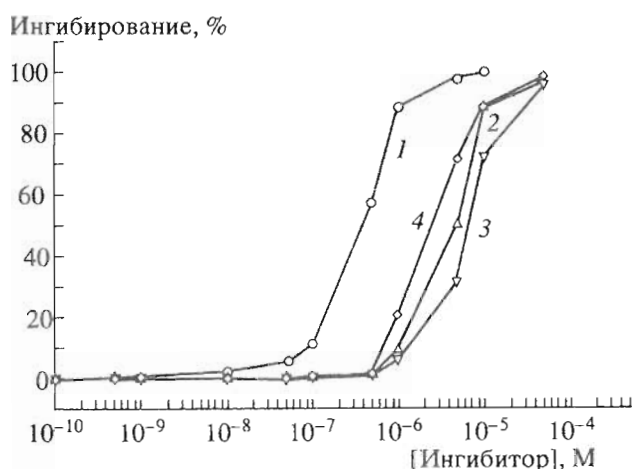


Рис. 2. Ингибирование специфического связывания ^3H Glu с Т-лимфоцитами из крови здоровых доноров немечеными лигандами: квискалатом (1) и пептидами Ala-Glu (2), Glu-Ala (3), Glu-Glu (4).

Конъюгаты меченой и немеченой L-глутаминовой кислоты с декстраном 500 (Dx) получали по методу [17]. Мольное соотношение Dx/Glu составляло 1 : 1000.

Клетки инкубировали с конъюгатом ^3H Glu-Dx в присутствии или в отсутствие 100-кратного мольного избытка немеченого конъюгата Glu-Dx или свободной L-глутаминовой кислоты как описано выше.

Обработка клеток трипсином. Т-Лимфоциты (10^7 /мл) инкубировали 30 мин при 37°C с трипсином (5 мг/мл) в среде 199. Затем активность трипсина блокировали, добавляя большой объем среды 199, содержащей фетальную сыворотку телянка. Клетки промывали три раза и использовали в эксперименте по связыванию. По тесту с трипановым синим жизнеспособность клеток после обработки трипсином превышала 95%.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 97-04-4946г).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jahr C.E., Stevens C.F. // Nature. 1987. V. 325. P. 522–525.
2. Cull-Candy S.G., Usowicz M.M. // Nature. 1987. V. 325. P. 525–528.
3. Mayer M.L., Westbrook G.L. // Prog. Neurobiol. 1987. V. 28. P. 197–276.
4. Collingridge C.L., Lester R.A. // Pharmacol. Rev. 1989. V. 40. P. 143–210.
5. Hollman M., Heinemann S. // Annu. Rev. Neurosci. 1994. V. 17. P. 31–108.

6. Sladeczek F., Pin J.-P., Recasens M., Bochaert J., Weiss S. // *Nature*. 1985. V. 317. P. 717–719.
7. Knopfel T., Kuhn R., Allgeier H. // *J. Med. Chem.* 1995. V. 38. P. 1417–1426.
8. Droge W., Eck H.-P., Betzler M., Schlag P., Drinds P., Ebert W. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1988. V. 114. P. 124–128.
9. Eck H.P., Frey H., Droge W. // *Int. Immunol.* 1989. V. 1. P. 367–372.
10. Molnar E., Varadi A., McIlhinney R.H.J., Ashcroft S.J.H. // *FEBS Lett.* 1995. V. 371. P. 253–267.
11. Bertrand G., Gross R., Puech R., Loudatieres-Mariani M.-M., Bockaert J. // *Br. J. Pharmacol.* 1992. V. 106. P. 354–359.
12. Mitin Y.V., Navolotskaya E.V., Vasilenko R.N., Abramov V.M., Zav'yalov V.P. // *Int. J. Peptide Protein Res.* 1993. V. 41. P. 517–521.
13. Boyun A. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968. V. 21 (suppl. 97). P. 77–88.
14. Aman P., Ehlin-Henriksson B., Klein G. // *J. Exp. Med.* 1984. V. 159. P. 208–220.
15. Chang K.-J., Jacobs S., Cuatrecasas P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1975. V. 406. P. 294–303.
16. Jacobs S., Chang K.-J., Cuatrecasas P. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975. V. 66. P. 687–692.
17. Goding J.W. // *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. L.: Acad. Press, 1986. P. 142–218.

The Interaction of *L*-Glutamic Acid with Human T Lymphocytes

I. A. Kostanyan*, E. V. Navolotskaya**, R. I. Nurieva***, V. P. Zav'yalov**, and V. M. Lipkin*

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

**Institute of Engineering Immunology, Lyubuchany, Moscow oblast, 142380 Russia

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

Abstract—A specific interaction of [³H]Glu with T lymphocytes from the blood of healthy donors ($K_d = 0.236 \mu\text{M}$) was revealed and described. It was found that unlabeled quisqualate, a structural analogue of *L*-glutamic acid, and unlabeled dipeptides Ala–Glu, Glu–Ala, and Glu–Glu competitively inhibit the specific binding of [³H]Glu to T lymphocytes (with K_i 0.19, 2.4, 3.4, and 1.2 μM , respectively). Binding experiments with conjugates of labeled and unlabeled glutamic acid with dextran showed that the receptors of [³H]Glu are localized on the outer surface of the plasma membrane of T lymphocytes.

Key words: *L*-glutamic acid, T lymphocyte, glutamate receptors, immune system.