



УДК 577.112.384.4.01.7

ГОРМОНОПОДОБНЫЕ СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКОГО ДЕКАПЕПТИДА, СООТВЕТСТВУЮЩЕГО АДРЕНОКОРТИКОТРОПИНОПОДОБНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНА G1 ЧЕЛОВЕКА

© 2000 г. Е. В. Наволоцкая[#], Т. А. Заргарова, Т. Н. Лепихова, В. Л. Туробов,
Р. И. Нуриева, Н. В. Малкова, В. П. Завьялов*, В. М. Липкин

Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142292,
Московская обл., г. Пущино, просп. Науки, 6;

* Институт инженерной иммунологии, 142380, Московская обл., Чеховский район, пос. Любучаны
Поступила в редакцию 26.03.99 г. Принята к печати 20.09.99 г.

Изучено антипролиферативное и иммуносупрессорное действие *in vitro* синтетического аденокортикотропин(АКТГ)-подобного декапептида H-Val-Lys-Lys-Pro-Gly-Ser-Ser-Val-Lys-Val-OH (авторское название пептида – иммунокортин), соответствующего фрагменту аминокислотной последовательности 11–20 варибельной части тяжелой цепи IgG1 человека. Иммунокортин в концентрациях 10^{-11} – 10^{-7} М ингибирует рост клеток человеческой лимфобластной линии МТ-4, подавляет бластную трансформацию тимоцитов, снижает спонтанную подвижность перитонеальных макрофагов и их бактерицидность по отношению к бактериям вирулентного штамма *Salmonella typhimurium* 415. С помощью ^{125}I -меченого “адресного” фрагмента АКТГ-[^{125}I]АКТГ-(13-24) показано, что клетки МТ-4 экспрессируют специфические рецепторы АКТГ (K_d 97 пМ). Иммунокортин и АКТГ человека в отличие от тяжелой цепи IgG1 конкурентно ингибировали связывание [^{125}I]АКТГ-(13-24) с этими рецепторами (K_{i1} 0.38, K_{i2} 0.34 нМ соответственно). Обнаружены и охарактеризованы специфические рецепторы АКТГ (K_d 5.8 нМ) на тимоцитах мыши. Показано, что немеченый иммунокортин конкурирует с меченым АКТГ-(13-24) за связывание с этими рецепторами (K_i 1.8 нМ). Установлено, что связывание иммунокортина с рецепторами на тимоцитах приводит к активации аденилатциклазы этих клеток и увеличению внутриклеточного содержания сАМР.

Ключевые слова: аденокортикотропин (АКТГ); IgG; пептиды; рецепторы; МТ-4-клетки; иммунокомпетентные клетки.

ВВЕДЕНИЕ

В начале 80-х годов сотрудники калифорнийского Института биологических исследований [1], пытаясь выделить из экстракта плаценты человека аденокортикотропный гормон (АКТГ) и β -эндорфин, использовали для этой цели в качестве аффинных сорбентов иммобилизованные антитела к данным гормонам. При этом ими был выделен полипептид с молекулярной массой 50 кДа, который был идентичен тяжелой (H) цепи IgG. Работа по выяснению причин такого эффекта привела к обнаружению в H-цепи последовательностей, гомологичных АКТГ и β -эндорфину. Фрагмент 364–377 константной части H-цепи IgG (SLTCLVKGFYPSDI) имеет 40% гомологии с антигенной детерминантой β -эндорфина (KSQTPLVTLFKNALKN), а фрагмент 9–22 варибельной части H-цепи IgG1 (AEVKKPGSSVKVSC) на 36% гомологичен

АКТГ-(11-24) (KRVGKKRRPVKVYP). Американские исследователи синтезировали четырнадцатичленный пептид, соответствующий β -эндорфин-подобной последовательности IgG, и установили способность этого пептида взаимодействовать с опиатными рецепторами головного мозга крысы [2].

Ранее мы синтезировали АКТГ-подобный декапептид (H-VKKGSSVKV-OH), соответствующий фрагменту аминокислотной последовательности 11–20 варибельной части H-цепи IgG1 человека (авторское название пептида – иммунокортин) и показали, что этот пептид способен с высоким средством связываться с рецепторами АКТГ и активировать аденилатциклазу синаптических мембран головного мозга мыши [3]. Цель настоящей работы – изучение влияния иммунокортина *in vitro* на клетки человеческой лимфобластной линии МТ-4 и мышечные тимоциты и макрофаги. Параллельно с иммунокортином был изучен синтетический пептид АКТГ-(13-24) (H-Val-Gly-Lys-

[#] Автор для переписки (тел.: (27)73-08-93; факс: (0967) 79-05-27; e-mail: navolots@fibkh.scrpukhov.su).

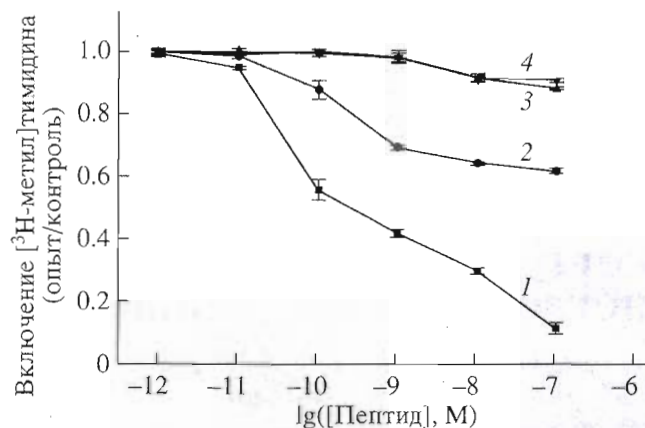


Рис. 1. Влияние иммунокортина (1), АКТГ человека (2), АКТГ-(13-24) (3) и тяжелой цепи IgG1 человека (4) на рост клеток МТ-4 *in vitro*.

Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-OH), подобный по структуре “адресной” части АКТГ, ответственной за связывание гормона с рецептором, но не обладающей биологической активностью [4]. Ранее показано, что при инкубации с синаптическими мембранами головного мозга АКТГ-(13-24) также демонстрировал высокоаффинное связывание (K_d 2.2 нМ), не приводящее к изменению аденилатциклазной активности [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние иммунокортина на рост клеток человеческой лимфобластной линии МТ-4 *in vitro*

На рис. 1 представлены результаты изучения влияния иммунокортина на рост клеток МТ-4. Параллельно были протестированы АКТГ человека, АКТГ-(13-24) и тяжелая цепь IgG1 человека. Видно, что иммунокортин и АКТГ в широком диапазоне концентраций (10^{-10} – 10^{-7} М) ингибируют включение [3 Н-метил]тимидина клетками МТ-4. Активность АКТГ-(13-24) и тяжелой цепи IgG1 была очень низкой (не более 10% контрольного уровня).

Ранее нами показано, что иммунокортин конкурирует с “адресным” меченым фрагментом АКТГ–[125 И]АКТГ-(13-24) за связывание с рецепторами АКТГ на синаптических мембранах головного мозга мыши (K_i 0.9 нМ) [3]. В настоящей работе с помощью [125 И]АКТГ-(13-24) впервые обнаружены и охарактеризованы специфические рецепторы АКТГ на клетках МТ-4. На рис. 2 приведен график Скэтчарда, характеризующий специфическое связывание [125 И]АКТГ-(13-24) с клетками МТ-4: K_d 97 пМ, $n = 2 \times 10^6$ сайтов связывания в расчете на одну клетку.

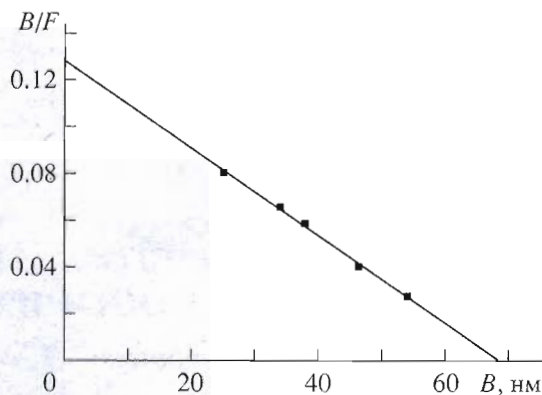


Рис. 2. Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания [125 И]АКТГ-(13-24) с клетками МТ-4. В и F – молярные концентрации связанного и свободного меченого пептида соответственно.

С целью выяснения специфичности выявленных рецепторов было изучено ингибирование связывания [125 И]АКТГ-(13-24) с клетками МТ-4 немечеными иммунокортином, АКТГ и тяжелой цепью IgG1. Кривые ингибирования, приведенные на рис. 3, свидетельствуют о том, что способностью ингибировать специфическое связывание меченого АКТГ-(13-24) обладают иммунокортин (K_i 0.38 нМ) и АКТГ (K_i 0.34 нМ). Тяжелая цепь IgG1 даже при высоких концентрациях практически не ингибировала связывание. Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы: 1) иммунокортин с высоким сродством связывается с рецепторами АКТГ на клетках МТ-4; 2) тяжелая цепь IgG1, содержащая последовательность иммунокортина, не способна к связыванию с этими рецепторами. Кроме того, специфичность и высокая аффинность связывания иммунокортина и АКТГ с рецепторами на клетках МТ-4

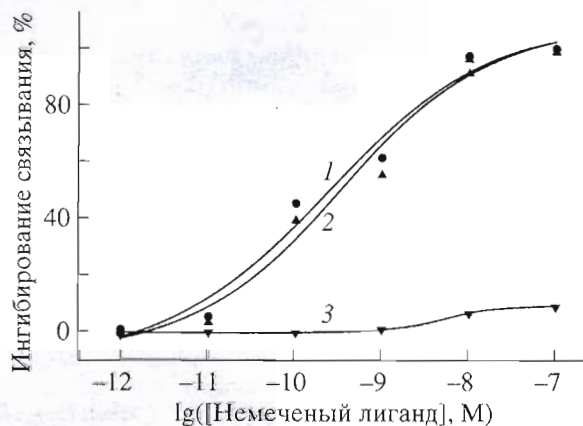


Рис. 3. Ингибирование специфического связывания 1 нМ [125 И]АКТГ-(13-24) немечеными иммунокортином (1), АКТГ человека (2) и тяжелой цепью IgG1 человека (3).

Таблица 1. Влияние иммунокортина на взаимодействие перитонеальных макрофагов мыши с бактериями вирулентного штамма *S. typhimurium* 415*

Концентрация пептида, М	Время фагоцитоза, ч	ФА (% ± SEM)	ЦПД (% ± SEM)	ФЧ ($n \pm SEM$)
–	1	65.33 ± 1.11	1.33 ± 0.27	3.90 ± 0.13
	2	72.67 ± 1.07	13.67 ± 0.69	10.17 ± 0.18
	4	72.33 ± 1.29	25.67 ± 1.41	11.17 ± 1.03
	7	29.00 ± 0.89	66.67 ± 0.62	15.50 ± 0.34
5×10^{-6}	1	49.50 ± 0.85	47.75 ± 1.72	7.25 ± 0.27
	2	0	100	–
5×10^{-7}	1	32.75 ± 0.72	66.50 ± 0.18	6.38 ± 0.19
	2	15.75 ± 0.56	84.25 ± 0.56	14.80 ± 0.33
	4	0	100	–
5×10^{-8}	1	78.50 ± 0.57	21.50 ± 0.57	5.88 ± 0.06
	2	70.75 ± 0.76	29.00 ± 0.85	6.15 ± 0.06
	4	44.00 ± 0.81	56.00 ± 0.81	8.90 ± 0.10
	7	0	100	–

* ФА – фагоцитарная активность; ЦПД – цитопатическое действие бактерий; ФЧ – фагоцитарное число.

позволяет предположить, что их антипролиферативное действие на эти клетки опосредовано через рецепторы АКТГ.

Известно, что МТ-4 чувствительны к действию α/β -интерферонов (IFN- α/β). IFN- α/β способны ингибировать рост клеток МТ-4 *in vitro* и *in vivo*, при этом у клеток МТ-4 присутствуют специфические рецепторы IFN- α/β ($K_d \sim 10^{-8}$ М) [4]. Недавно синтезированы пептиды – фрагменты IFN- $\alpha 2$ человека, способные при концентрациях 10^{-7} – 10^{-5} М ингибировать рост клеток МТ-4 и специфически связываться с рецепторами IFN- α/β [5]. В этой связи следует отметить, что активность иммунокортина по отношению к клеткам МТ-4 много выше, чем у IFN- α/β и фрагментов IFN- $\alpha 2$.

Влияние иммунокортина на активность иммунокомпетентных клеток мыши *in vitro*

Полученные нами результаты показали, что иммунокортин в диапазоне концентраций 3.5×10^{-7} – 10^{-5} М подавляет бласт-трансформацию тимоцитов, индуцированную конканавалином А (рис. 4). Супрессорный эффект пептида не был связан с его цитотоксическим действием: жизнеспособность клеток по тесту с трипановым синим сохранялась на уровне 95–97%.

Иммунокортин подавлял бактерицидную активность перитонеальных макрофагов при фагоцитозе бактерий *Salmonella typhimurium* 415 *in vitro*. В табл. 1 приведены значения основных показателей фагоцитоза (ФА, ЦПД и ФЧ) при взаимодействии этих бактерий с макрофагами в присутствии пептида в разных концентрациях и

без него (контроль). Фагоцитарная активность (ФА) – число макрофагов (%), участвующих в фагоцитозе; цитопатическое действие бактерий (ЦПД) – число фагоцитов (%), разрушенных внутриклеточными бактериями; фагоцитарное число (ФЧ) – среднее число микробов, приходящееся на один макрофаг.

Видно, что в присутствии иммунокортина в концентрации 5×10^{-6} М полное разрушение фагоцитов внутриклеточными сальмонеллами наблюдалось через 2 ч фагоцитоза. При концентрации пептида в среде 5×10^{-7} М монослой макрофагов был разрушен через 4 ч, а при концентрации 5×10^{-8} М – через 7 ч с момента инфицирования.

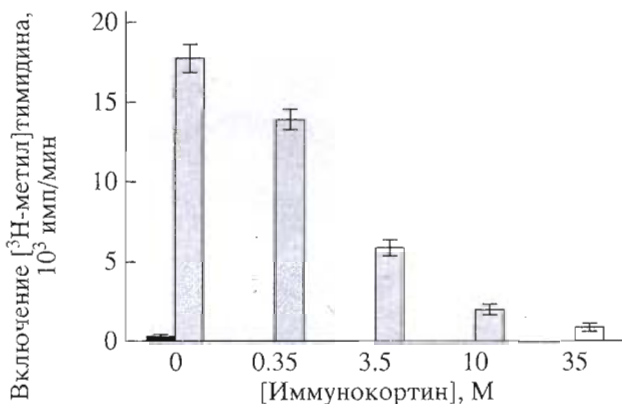


Рис. 4. Влияние иммунокортина на индуцированную конканавалином А бластную трансформацию тимоцитов мыши. По оси абсцисс – молярная концентрация пептида; по оси ординат – включение [³Н-метил]тимидина (имп/мин).

Таблица 2. Влияние иммунокортина и АКТГ-(13-24)-пептида на аденилатциклазную активность плазматических мембран тимоцитов и перитонеальных макрофагов мыши

Концентрация, М		Аденилатциклазная активность (нмоль сАМР/мг белка за 10 мин)	
иммунокортин	АКТГ-(13-24)	тимоциты	макрофаги
–	–	0.345 ± 0.017	0.485 ± 0.024
10 ⁻⁷	–	0.742 ± 0.037	0.652 ± 0.033
10 ⁻⁶	–	1.018 ± 0.051	0.973 ± 0.049
10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	0.342 ± 0.017	0.476 ± 0.024
10 ⁻⁵	–	0.928 ± 0.046	0.511 ± 0.026
–	10 ⁻⁶	0.342 ± 0.017	0.478 ± 0.024
–	10 ⁻⁵	0.351 ± 0.018	0.480 ± 0.024

В то же время в контроле к седьмому часу фагоцитоза ЦПД не превышало 70%. Изученный параллельно пептид АКТГ-(13-24) не влиял на фагоцитоз: в его присутствии в диапазоне концентраций 5×10^{-10} – 5×10^{-5} М показатели фагоцитоза не отличались от контрольных значений. В то же время АКТГ-(13-24) при совместном введении с иммунокортином (5×10^{-7} М) в концентрации 5×10^{-5} М полностью ингибировал, а в концентрации 5×10^{-8} М практически не затрагивал супрессорный эффект иммунокортина при фагоцитозе *S. typhimurium*.

Изучение влияния иммунокортина на спонтанную миграцию мышинных перитонеальных макрофагов из агарозы показало, что увеличение его концентрации в среде сопровождается уменьшением индекса миграции (ИМ) (рис. 5), что свидетельствует об ингибирующем действии пептида на клеточную подвижность.

Результаты, приведенные в табл. 2, показывают, что в диапазоне концентраций 10^{-7} – 10^{-5} М иммунокортин активирует аденилатциклазу плазматических мембран тимоцитов и перитонеальных

макрофагов мышей, в то время как АКТГ-(13-24) не влияет на активность фермента, но в обоих случаях блокирует активирующий эффект иммунокортина при соотношении концентраций иммунокортина/АКТГ-(13-24) = 1 : 10.

В присутствии иммунокортина (4×10^{-7} – 4×10^{-6} М) наблюдалось увеличение внутриклеточной концентрации сАМР в макрофагах. Результаты, приведенные в табл. 3, показывают, что через 15 мин совместной инкубации макрофагов и 4×10^{-7} М пептида концентрация сАМР внутри макрофагов возрастала почти в 3 раза, а через 2 ч снижалась до контрольного уровня. АКТГ-(13-24) в параллельном эксперименте не вызывал достоверных изменений внутриклеточной концентрации сАМР (табл. 3).

Ранее было установлено, что взаимодействие АКТГ с рецептором приводит к активации аденилатциклазы [6, 7]. Результаты, представленные в настоящей работе, показывают, что иммунокортин активирует аденилатциклазу плазматических мембран тимоцитов и макрофагов, что приводит к увеличению содержания сАМР в этих клетках.

Система иммунорегуляции вместе с эндокринной и центральной нервной системами образуют единую интегральную сеть биорегуляции живых организмов. В последнее время обнаруживаются новые экспериментальные подтверждения, свидетельствующие в пользу гипотезы о существовании наряду с эндокринной системой и тканевыми гормонами (кининами) еще одного пути, основанного на действии клеточных гормонов, тетинов, представляющих собой олигопептиды – продукты ограниченного протеолиза белков *in situ*. Предшественники тетинов – молекулы иммуноглобулинов, интерферонов, ростовых факторов, интерлейкинов и других биологически активных белков. К тетинам следует отнести тафцин (TKPR), пептиды семейства ригина (GQPR, GRPK, GKPR) и эскарина (SKAK, SKAR, SKTK), иммунопозитины (RPDVY, EPWEY, RPEVN), C-концевые фрагменты иммуноглобулинов (RAVSVNPGK, KLSLSPGK), ти-

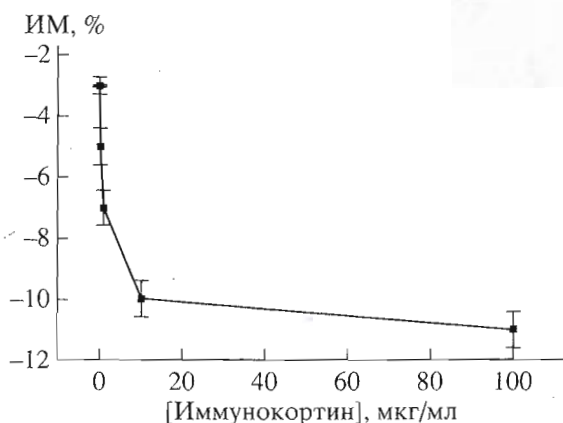
**Рис. 5.** Влияние иммунокортина на спонтанную миграцию перитонеальных макрофагов мыши. ИМ – индекс миграции.

Таблица 3. Влияние иммунокортина и АКТГ-(13-24) на внутриклеточное содержание цАМФ в перитонеальных макрофагах мыши

Пептид	Концентрация, М	Время контакта макрофагов и пептида, мин	Содержание сАМФ, (опыт/контроль) \pm SEM
Иммунокортин	4×10^{-6}	15	2.67 ± 0.12
		30	2.78 ± 0.08
		60	2.87 ± 0.15
		120	2.48 ± 0.03
	4×10^{-7}	15	2.98 ± 0.20
		30	2.49 ± 0.18
		60	1.24 ± 0.20
		120	0.92 ± 0.13
АКТГ-(13-24)	4×10^{-6}	15	1.38 ± 0.23
		30	1.22 ± 0.18
		60	1.01 ± 0.07
		120	1.18 ± 0.12
	4×10^{-7}	15	1.19 ± 0.21
		30	0.89 ± 0.27
		60	1.20 ± 0.16
		120	1.11 ± 0.09

розинсодержащие пентапептидные фрагменты интерферонов (семейство ритлия RITLY), а также многие другие, как правило полярные, фрагменты иммуноактивных белков [8].

Можно считать доказанным, что иммунокортин обладает всеми свойствами клеточных гормонов. Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что иммунокортин обладает хорошо выраженными иммуносупрессорными свойствами, которые проявляются в подавлении митогениндуцированной пролиферации тимоцитов мыши, снижении спонтанной подвижности перитонеальных макрофагов мыши и уменьшении их бактерицидности по отношению к бактериям вирулентного штамма *S. typhimurium* 415. Ранее нами были обнаружены нейротропные свойства иммунокортина и показана его способность с высоким сродством связываться с рецепторами АКТГ на синаптических мембранах головного мозга мыши [3]. Следовательно, иммунокортин обладает одновременно иммуносупрессорной и нейротропной активностью. Взаимодействие иммунокортина с тимоцитами, макрофагами мыши, а также синаптическими мембранами головного мозга мыши включает в себя связывание с рецептором АКТГ, активацию аденилатциклазы, увеличение внутриклеточного уровня сАМФ, что полностью соответствует гормоноподобной природе данного вещества.

Иммунокортин ранее не был изучен. Его свойства и механизм действия впервые описаны нами. В настоящее время мы не располагаем данными об образовании пептида *in vivo* и его метаболизме, однако, учитывая, что расщепление иммуноглобулинов в составе комплекса антиген-антитело в физиологических условиях происходит в фагоцитах, вполне вероятно, что подобно ряду иммуноактивных пептидов иммуноглобулинового происхождения [9], иммунокортин или один из его ближайших гомологов также может образовываться в макрофагах.

Известно, что в случае подклассов IgG наиболее сильный процессинг Fc-субъединиц происходит в кислой среде фаголизосом [10, 11]. Образующиеся под действием кислых гидролаз пептиды посредством секреции или в результате гибели фагоцитов могут попадать в окружающую очаг воспаления среду и служить своеобразными сигналами бедствия, вовлекающими клетки иммунной системы в процесс элиминирования антигена. Fab-фрагменты в кислой среде имеют более кооперативную, устойчивую к протеолизу структуру [12]. Однако в среде, близкой к нейтральной, кооперативность переменных (V_H) частей уменьшается и они процессируются под действием нейтральных протеаз. При этом V_{H1} -домены могут явиться источником пептида с АКТГ-подобной последовательностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: конканавалин А (Pharmacia, Швеция); L-глутамин и N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-2-этансульфоновую кислоту (HEPES) (Flow, США); пенициллин и стрептомицин (Gibco, США); агарозу, сахарозу, BSA, EDTA, EGTA, Трис, фенилметилсульфонилфторид (PMSF), 1,3,4,6-тетрахлоро-3 α ,6 α -дифенилгликолюрил (иодоген) (Serva, ФРГ), сцинтиллятор Unisolv 100 (Amersham, Англия); [³H-метил]тимидин (уд. активность 76 Ки/ммоль, Amersham, Англия); Al₂O₃ по Брокману II (Reanal, Венгрия). Остальные реактивы соответствовали квалификации "х. ч." и "ос. ч." Для культивирования клеток использовали среду 199 (ЦНИИ вакцин и сывороток, Москва) и RPMI-1640 (Serva, ФРГ). Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы Mono-Q (Millipore, США).

Иммунокортин и фрагменты АКТГ синтезировали методом активированных эфиров как описано ранее [3]. Молекулярную массу пептидов определяли с помощью масс-спектрометрического анализа.

Экспериментальные животные: мыши линии СВА возрастом 4–6 недель.

Культивирование клеток: клетки человеческой Т-лимфобластной линии МТ-4 культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 90% эмбриональной сыворотки теленка и гентамицин (50 мкг/мл) при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

В работе использовали вирулентный штамм *S. typhimurium* 415 с типичными морфологическими и функциональными свойствами и LD₅₀ примерно 100 микробных клеток при внутрибрюшинном заражении белых мышей. Сальмонеллезную бактериальную культуру выращивали в течение 4–6 ч при 37°C в бульоне Хоттингера, пересевали на мясо-пептонный агар и инкубировали при 37°C в течение 18 ч.

Влияние иммунокортина на бласт-трансформацию клеток тимуса *in vitro* изучали, используя методику [13]: в лунки планшета для микрокультивирования клеток вносили по 100 мкл суспензии тимоцитов, полученных от 3–4-х недельных мышей (5 × 10⁵ клеток/мл), 50 мкл раствора конканавалина А (Con A) (2 мкг/мл) и 100 мкл раствора иммунокортина известной концентрации. Каждую опытную и контрольную пробу ставили в 3–4-х параллельных культурах. Контролем служили пробы без Con A (а); без Con A с пептидом (б); с Con A без пептида (с). Планшет инкубировали 72 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Через 60 ч в лунки вносили [³H-метил]тимидин (1 мкКи/лунка). По окончании инкубации содержимое каждой лунки переносили на отдельный фильтр и промывали 100-кратным объемом физиологического раствора. Радиоактивность на фильтрах определяли в сцинтилляционном счетчике 1211

Minibeta (LKB, Швеция). Состав среды культивирования: среда RPMI-1640, содержащая глутамин (2 мМ), стрептомицин и пенициллин (100 мкг/мл каждого), HEPES (20 мМ) и термически инактивированную (56°C, 30 мин) эмбриональную сыворотку теленка (5%).

Влияние пептидов и белков на рост клеток МТ-4 изучали, используя описанную выше схему эксперимента, но без добавления митогена. [³H-Метил]тимидин (1 мкКи/лунка) вносили за 4 ч до окончания инкубации.

Иодирование АКТГ-(13-24) (10 мкг) проводили по методу [14] с помощью Na¹²⁵I (1 мКи) и иодогена. Удельная активность [¹²⁵I]АКТГ-(13-24) составила 165 Ки/ммоль.

Связывание [¹²⁵I]АКТГ-(13-24) с клетками МТ-4 и тимоцитами проводили в соответствии со следующей схемой: по 10⁶ клеток в каждой пробирке инкубировали с [¹²⁵I]АКТГ-(13-24) (10⁻¹⁰–10⁻⁷ М) в 1 мл среды 199, содержащей 20 мМ NaN₃ и 25 мМ HEPES, pH 7.4 при 4°C в течение 1 ч. По окончании инкубации реакционную смесь фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/B (Whatman, Англия). Радиоактивность на фильтрах подсчитывали с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика (Rack-Beta LKB Wallac, Швеция). Неспецифическое связывание иодированного АКТГ-(13-24) оценивали в присутствии 10 мкМ немеченого АКТГ-(13-24). Равновесные константы диссоциации (K_d) и плотность рецепторов (n) определяли по методу [15].

Для оценки способности немеченых белков и пептидов ингибировать специфическое связывание [¹²⁵I]АКТГ-(13-24) с клетками МТ-4 и тимоцитами по 10⁶ клеток в каждой пробирке инкубировали с 1 нМ меченого АКТГ-(13-24) и немеченым лигандом в возрастающих концентрациях (10⁻¹²–10⁻⁵ М) в 1 мл среды 199 при 4°C в течение 1 ч. Дальнейшие процедуры проводили как описано выше. На основании полученных данных строили графики зависимости специфического связывания 1 нМ [¹²⁵I]АКТГ-(13-24) от молярной концентрации потенциального ингибитора (кривые ингибирования). Константу ингибирования (K_i) определяли по формуле [16]:

$$K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d),$$

где величину IC₅₀ определяли графически; [L] – молярная концентрация меченого лиганда (для [¹²⁵I]АКТГ-(13-24) – 1 нМ), K_d – равновесная константа диссоциации комплекса меченый АКТГ-(13-24)–рецептор.

Перитонеальные макрофаги мышей выделяли и культивировали согласно рекомендациям [17]. Изучение фагоцитарной активности макрофагов проводили по разработанной нами методике [18]. Полученные с помощью соответствующих препаративных процедур монослой макрофагов на

покровных стеклах культивировали при 37°C в стерильных стеклянных пробирках со средой 199, содержащей стрептомицин и пенициллин (по 100 мкг/мл) и инактивированную эмбриональную сыворотку теленка (5%). Спустя сутки макрофаги заражали средой 199, содержащей сыворотку и бактериальную культуру *S. typhimurium* 415 в таком количестве, чтобы ее конечное разведение составляло 10^8 микробных клеток/мл. Через 2 ч контакт между микробами и макрофагами прерывали, заменяя среду заражения средой культивирования, содержащей антибиотики. Для предотвращения захвата макрофагами микробов, освобождающихся из разрушенных фагоцитов, в дальнейшем через каждые 2 ч среду культивирования заменяли свежей. Фиксирование макрофагов на покровных стеклах (по 3 на каждую временную точку) проводили через 1, 2, 4, 6, 7 и 24 ч (метанол, 7 мин). Затем полученные препараты окрашивали 0.1% водным раствором красителей азур II-эозин в течение 5 мин. Под микроскопом при увеличении $\times 1350$ на каждом стекле просматривали по 300 клеток, определяя следующие показатели фагоцитоза: ФА, ЦПД, ФЧ. Для оценки подвижности макрофагов использовали микрометод изучения спонтанной миграции клеток системы мононуклеарных фагоцитов из капли агарозы [19]. Предварительно готовили 0.4% раствор агарозы: к 3 мл среды 199 добавляли 20 мг агарозы, выдерживали в кипящей водяной бане и охлаждали до 60°C. К полученному раствору добавляли 1.5 мл термически инактивированной эмбриональной сыворотки теленка в 0.5 мл среды 199, содержащей остальные ингредиенты в таком количестве, чтобы приготовленный раствор агарозы содержал 10 мМ HEPES и по 50 мкг/мл стрептомицина и пенициллина. Суспензию макрофагов в среде 199 (концентрация 10^9 клеток/мл) смешивали с равным объемом приготовленного раствора агарозы и подогревали до 37°C. Затем в лунки плоскодонного планшета вносили по 1 мкл клеточной суспензии в агарозе и планшет термостатировали при 4°C в течение 15 мин. После застывания агарозы в каждую лунку добавляли по 200 мкл среды 199, содержащей 10 мМ HEPES, стрептомицин и пенициллин (50 мкг/мл каждого), эмбриональную сыворотку (15%) и иммунокортин (диапазон концентраций – 10^{-9} – 10^{-3} М). Планшеты инкубировали 18–20 ч в атмосфере 5% CO_2 при 37°C. Реакцию учитывали следующим образом: под микроскопом с помощью окулярного микрометра определяли диаметр зоны миграции клеток из капли агарозы и подсчитывали индекс миграции (ИМ) по формуле:

$$\text{ИМ} = \left(\frac{\text{диаметр зоны миграции в опыте}}{\text{диаметр зоны миграции в контроле}} \right) \times 100\%$$

Активность аденилатциклазы определяли с помощью $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ по методу [20]. Состав среды для проведения реакции: 40 мМ Трис-НСl, рН 7.4, содержащий 50 мкМ АТР, 4 мМ сАМР, 12 мМ фосфоэноллипуват, пируваткиназу (2 мкг/мл). В стеклянные силиконированные конические пробирки, находящиеся в ледяной бане, вносили $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (200000–500000 имп/мин) в 50 мкл среды и 50 мкл исследуемого материала (опыт) или такой же объем буфера (контроль). Пробирки переносили в термостат и выдерживали при 34°C в течение 45 мин. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0.5 н. НСl. После этого пробирки помещали в кипящую водяную баню на 15 мин, а затем переносили в ледяную баню и добавляли в каждую по 100 мкл 1.5 М имидазола. Содержимое каждой пробирки пропускали через отдельную колонку с $1\text{ см}^3\text{ Al}_2\text{O}_3$ (по Брокману II степень активности) и промывали 5 мл дистиллированной воды. Активность фермента определяли по убыли субстрата и выражали в нмолях сАМР, образовавшегося за 10 мин в расчете на 1 мг белка исследуемого материала.

Для определения уровня сАМР в макрофагах из них получали экстракты с помощью 5% ТСА [20]. Содержание сАМР в экстрактах определяли, используя "Cyclic-AMP-Assay-Kit" (Amersham, Англия) в соответствии с прилагаемым фирмой руководством.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 97-04-49227) и Международного научно-технического центра (проект № 91).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Julliard J.H., Shibasaki T., Ling N., Guillamin R. // Science. 1980. V. 208. P. 183–185.
2. Houck J.C., Kimball C., Chang C., Pedigo N.W., Yamamura H.I. // Science. 1980. V. 207. P. 78–79.
3. 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.
4. Pestka S., Langer J.A., Zoon K.C., Samuel C.E. // Ann. Rev. Biochem. 1987. V. 56. P. 727–777.
5. Danilkovich A., Freze K., Romashkova J., Valujskikh A., Makarov E., Targoni O., Makarova N., Kushch A. // FEBS Lett. 1995. V. 369. P. 161–164.
6. Kapas S., Canmas F.M., Hinson J.P., Clark A.J. // Endocrinol. 1996. V. 137. P. 3291–3294.
7. Naville D., Barjhoux L., Jaillard C., Saez J., Durand P., Begeot M. // Mol. Cell. Endocrinol. 1997. V. 129. P. 83–90.
8. Чипенс Г.И., Веретенникова Н.И., Вегнер Р.Э., Гниломедова Л.Е., Розенталь Г.Ф. Структурные основы действия пептидных и белковых иммунорегуляторов. Рига: Знание, 1990.

9. Johnson H.M., Smith E.M., Torres E.A., Blalock J.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 4171–4174.
10. Abramov V.M., Arkhangelskaya Z.A., Zav'yalov V.P. // Biochim. Biophys. Acta. 1983. V. 742. P. 295–302.
11. Tischenko V.M., Zav'yalov V.P., Medgyesi G.A., Potekhin S.A., Privalov P.L. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 126. P. 517–521.
12. Schneider I.I., De Dwe C., Trowet D. // J. Cell. Biol. 1981. V. 88. P. 380–387.
13. Zav'yalov V.P., Navolotskaya E.V., Abramov V.M., Galaktionov V.G., Isaev I.S., Kawrov O.A., Kozhich A.T., Maiorov V.A., Prusakov A.N., Vasilenko R.N., Volodina E.Yu. // FEBS Lett. 1991. V. 278. P. 187–189.
14. Salacinski P.R.P., Lean C.M., Sykes J.E.C., Climent-Jones V.V., Lowry P.J. // Anal. Biochem. 1981. V. 117. P. 136–146.
15. Chang K.-J., Jacobs S., Cuatrecasas P. // Biochim. Biophys. Acta. 1975. V. 406. P. 294–303.
16. Chang Y.C., Prusoff W.H. // Biochem. Pharmacol. 1973. V. 22. P. 3099–3108.
17. Учитель И.Я. Макрофаги в иммунитете М.: Медицина, 1978. С. 168–180.
18. Наволоцкая Е.В. Структурно-функциональные исследования α_2 -интерферона, интерлейкина-2 и иммуноглобулина G человека с помощью синтетических пептидов. Дис. ... д-ра биол. наук. М.: Институт иммунологии, 1994.
19. Fahlbusch B., Dornberger G. // Acta Biol. Med. Germ. 1979. V. 38. P. 1453–1460.
20. Saltarelli D., Fisher S., Gacon G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1985. V. 127. P. 318–325.
21. Подопригора Г.И., Абакумов О.Ю. // Бюлл. экпер. биол. мед. 1976. Т. 82. С. 953–956.

Hormone Activity of a Synthetic Decapeptide with the Adrenocorticotropin-like Sequence of Human Immunoglobulin G1

E. V. Navolotskaya*[#], T. A. Zargarova*, T. N. Lepikhova*, V. L. Turobov*,
R. I. Nurieva*, N. V. Malkova*, V. P. Zav'yalov**[#], and V. M. Lipkin*

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch, Russian Academy of Sciences,
pr. Nauki 6, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

**Institute of Engineering Immunology, pos. Lyubuchany, Chekhov raion, Moscow oblast, 142380 Russia

The antiproliferative and immunosuppressive *in vitro* effects of immunocortin, a synthetic adrenocorticotropin-like (ACTH-like) decapeptide H-Val-Lys-Lys-Pro-Gly-Ser-Ser-Val-Lys-Val-OH, whose sequence corresponds to segment 11–20 of the variable part of the human IgG1 heavy chain, were studied. At concentrations of 10^{-11} – 10^{-7} M, immunocortin was found to inhibit the growth of the human MT-4 T-lymphoblastoid cell line, to suppress the blast transformation of thymocytes, and to decrease the spontaneous mobility of peritoneal macrophages and their bactericidal action toward the virulent strain *Salmonella typhimurium* 415. By using a 125 I-labeled “addressing” fragment of ACTH ($[^{125}\text{I}]\text{ACTH-(13–24)}$), we showed that MT-4 cells express specific receptors for ACTH (K_d 97 pM). Immunocortin and human ACTH (but not the heavy chain of IgG1) competitively inhibited the binding of $[^{125}\text{I}]\text{ACTH-(13–24)}$ to these receptors with K_{i1} of 0.38 and K_{i2} of 0.34 nM, respectively. Specific receptors for ACTH (K_d 5.8 nM) on mouse thymocytes were detected and characterized. The unlabeled immunocortin was shown to compete with labeled ACTH-(13–24) for binding to these receptors ($K_i = 1.8$ nM) and this binding of immunocortin to receptors on thymocytes activates adenylate cyclase from these cells and increases the intracellular concentration of cAMP.

Key words: adrenocorticotropic hormone, ACTH, IgG, peptides, receptors, MT-4 cells, immunocompetent cells

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: (27) 73-0893; fax: (0967) 79-0527;
e-mail: navolots@fibkh.serpukhov.su.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 1. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.