



УДК 577.112.6:577.171.617

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ДЕКАПЕПТИДА SLTCLVKGFY С Т-ЛИМФОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА

© 2001 г. Е. В. Наволоцкая\*<sup>#</sup>, Н. В. Малкова\*, Т. Н. Лепихова\*, С. Б. Краснова\*, Т. А. Заргарова\*, В. П. Завьялов\*\*<sup>#</sup>, В. М. Липкин\*

\* Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, г. Пущино, просп. Науки, 6, Московская обл.;

\*\* Институт инженерной иммунологии, 142380, п. Любучаны, Московская обл.

Поступила в редакцию 30.10.2000 г. Принята к печати 17.01.2001 г.

Установлено, что синтетический декапептид SLTCLVKGFY, соответствующий аминокислотной последовательности 364–373 тяжелой цепи IgG человека (авторское название пептида – иммуноर्फин (Imm)), конкурировал с <sup>125</sup>I-меченым β-эндорфином за связывание с высокоаффинными рецепторами на Т-лимфоцитах, выделенных из крови здоровых доноров ( $K_i$  0,6 нМ). Помимо иммуноर्फина, ингибирующей способностью обладали также его фрагменты 3–10, 4–10, 5–10 и 6–10 ( $K_i$  2,2, 3,4, 8,0 и 15 нМ соответственно). Исследование специфичности выявленных рецепторов показало, что они нечувствительны к налоксону и [Met]энкефалину, т.е. не являются опиоидными. Определены значения  $K_d$ , характеризующие специфическое связывание с рецептором <sup>125</sup>I-меченых иммуноर्फина и Imm-(6–10)-пептида (7,4 и 36,3 нМ соответственно).

*Ключевые слова:* опиоидные пептиды; IgG; опиоидные рецепторы; Т-лимфоциты.

### ВВЕДЕНИЕ

В начале 80-х годов американские исследователи Джулиард и др. [1] с целью выделения из экстракта плаценты человека β-эндорфина использовали в качестве аффинных сорбентов иммобилизованные антитела к данному гормону. При этом ими был выделен полипептид с молекулярной массой 50 кДа, который при детальном анализе оказался тяжелой цепью IgG (H-цепь). Выяснение причин такого эффекта привело к обнаружению в H-цепи последовательности, гомологичной β-эндорфину. Было установлено, что фрагмент 364–377 (SLTCLVKGFYPSDI) H-цепи IgG имеет 40% подобия с фрагментом 10–23 β-эндорфина (SQTPLVTLFKNAIK). Хоук с сотр. [2] синтезировали тетрадекапептид, полностью соответствующий β-эндорфинподобной последовательности 364–377 IgG, и показали способность пептида связываться с опиоидными рецепторами головного мозга крысы.

Ранее нами был синтезирован декапептид SLTCLVKGFY, соответствующий аминокислотной последовательности 364–373 тяжелой цепи IgG подклассов 1–4 (рис. 1, авторское название пептида – иммуноर्फин (Imm)) [3], и установлена способность этого пептида ингибировать связывание <sup>125</sup>I-меченого β-эндорфина с высокоаффин-

ными рецепторами на поверхности перитонеальных макрофагов мыши ( $K_i$  5,9 нМ). Изучение специфичности этих рецепторов показало, что они не способны взаимодействовать с природными опиоидными пептидами [Met]энкефалином и [Leu]энкефалином и антагонистом μ-, κ-, δ- и σ-опиоидных рецепторов налоксоном [3].

Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия иммуноर्फина и его фрагментов с Т-лимфоцитами, выделенными из крови здоровых доноров.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

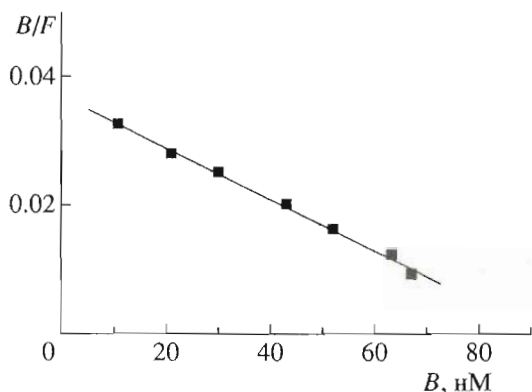
На рис. 2 приведен график Скэтчарда, характеризующий специфическое связывание <sup>125</sup>I-ме-

	1	5	
[Met]Enk	YGGFM		
	1	10	
α-End	YGGFMTSEKSQTPLVT		
	1	10	
γ-End	YGGFMTSEKSQTPLVTL		
	1	10	20
			30
β-End	YGGFMTSEKSQTPLVTLFKNAIKNAUKKGE		
HuIgG-(364–377)	SLTCLVKGFYPSDI		
	1	10	
Imm	SLTCLVKGFY		

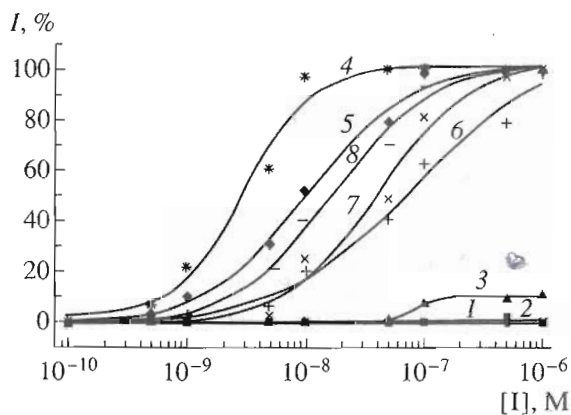
**Рис. 1.** Сравнение аминокислотных последовательностей [Met]Enk, α-, γ-, β-эндорфина, β-эндорфинподобного фрагмента тяжелой цепи IgG человека и иммуноर्फина. Совпадающие остатки выделены жирным шрифтом.

Сокращения: End – эндорфин; Enk – энкефалин; Imm – иммуноर्फин.

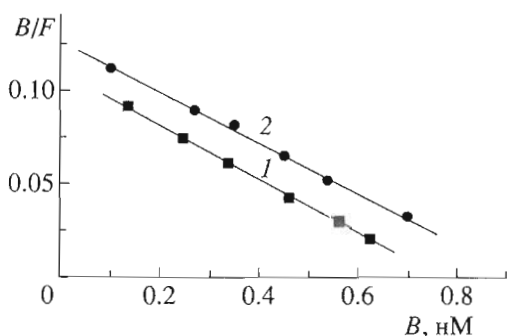
<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (27) 73-08-93; факс: (0967) 79-0527; эл. почта: navolots@fibkh.serpukhov.su).



**Рис. 2.** Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания  $^{125}\text{I}$ -меченого  $\beta$ -эндорфина с Т-лимфоцитами крови человека.  $B$  и  $F$  – молярные концентрации связанного и свободного меченого пептида соответственно.



**Рис. 3.** Ингибирование специфического связывания 1 нМ  $^{125}\text{I}$ -меченого  $\beta$ -эндорфина с Т-лимфоцитами крови человека ( $10^6$  клеток/мл) налоксонем (1), [Met]Enk (2), Imn-(9-10)- или Imn-(8-10)-, или Imn-(7-10)-пептидом (3), пептидами Imn-(6-10) (4), Imn-(5-10) (5), Imn-(4-10) (6), Imn-(3-10) (7), Imn (8).  $I$  – процент ингибирования;  $[I]$  – молярная концентрация ингибитора.



**Рис. 4.** Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания  $^{125}\text{I}$ Imn (1) с Т-лимфоцитами, то же в присутствии 1 мкМ налоксона (2).  $B$  и  $F$  – молярные концентрации связанного и свободного меченого Imn соответственно.

ченного  $\beta$ -эндорфина с Т-лимфоцитами крови человека. График представляет собой прямую линию, что свидетельствует о наличии одного класса рецепторов к  $\beta$ -эндорфину на поверхности этих клеток,  $K_d$   $0.25 \pm 0.03$  нМ; плотность рецепторов  $n$   $(6.0 \pm 0.7) \times 10^7$ . Для характеристики специфичности выявленных рецепторов в качестве потенциальных конкурентов  $\beta$ -эндорфина были протестированы немеченые налоксон, [Met]Enk, иммунорфин и его С-концевые фрагменты 9–10, 8–10, 7–10, 6–10, 5–10, 4–10 и 3–10 (рис. 3, таблица). На основании полученных данных можно сделать следующие выводы: во-первых, данный тип рецепторов нечувствителен к [Met]Enk и налоксону; во-вторых, самым коротким активным фрагментом иммунорфина является Imn-(6–10)-пептид. Видно, что ингибирующая способность фрагментов возрастает по мере удлинения цепи к N-концу и максимальна у иммунорфина.

Из данных эксперимента по специфическому связыванию  $^{125}\text{I}$ -меченого иммунорфина с Т-лимфоцитами (рис. 4) в отсутствие (линия 1;  $K_d$   $7.0 \pm 0.3$  нМ;  $n$   $(5.0 \pm 0.6) \times 10^5$ ) и в присутствии 1 мкМ налоксона (линия 2;  $K_d$   $7.4 \pm 0.2$  нМ;  $n$   $(5.6 \pm 0.6) \times 10^5$ ) видно, что налоксон не оказывает существенного влияния на кинетику связывания меченого иммунорфина с рецептором: сдвиг графика Скэтчарда в присутствии налоксона не превышал ошибки эксперимента.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что в данных экспериментальных условиях на Т-лимфоцитах обнаруживается один класс рецепторов к  $\beta$ -эндорфину, нечувствительных к налоксону – антагонисту  $\mu$ -,  $\kappa$ -,  $\delta$ - и  $\sigma$ -опиоидных рецепторов. Таким образом, выявленные рецепторы не являются опиоидными.

Эксперименты показали, что [Met]Enk не влияет на связывание  $^{125}\text{I}$ -меченого  $\beta$ -эндорфина с рецепторами на Т-лимфоцитах. Последовательность [Met]Enk идентична фрагменту 1–5  $\beta$ -эндорфина (рис. 1). Именно эта последовательность обеспечивает связывание обоих пептидов с опиоидными рецепторами [4, 5]. Последовательность иммунорфина подобна последовательности 10–19 в молекуле  $\beta$ -эндорфина (рис. 1). Мы показали, что иммунорфин ингибирует связывание  $^{125}\text{I}$ -меченого  $\beta$ -эндорфина с рецепторами Т-лимфоцитов. Следовательно, связывание  $\beta$ -эндорфина с выявленными рецепторами на Т-лимфоцитах обеспечивает в отличие от случая с опиоидными рецепторами не N-концевой пентапептид, а центральная часть молекулы.

Полученные результаты полностью согласуются с литературными данными. Практически одновременно несколько групп исследователей обнаружили способность  $\beta$ -эндорфина влиять на пролиферацию Т-лимфоцитов *in vitro* (сообщалось как о стимулирующем, так и об ингибирующем



щем эффектах) [6–9]. С целью разрешения этого противоречия пять опиоидных пептидов ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ End-, [Met]Enk и [Leu]Enk) были протестированы на способность влиять на индуцируемую конканавалином А пролиферацию Т-клеток селезенки крыс [10]. Оказалось, что постоянное присутствие любого из этих пептидов в среде культивирования спленоцитов не влияет на пролиферативный ответ этих клеток. В то же время 30-минутная предынкубация Т-клеток с  $\beta$ -эндорфином (но не с другими пептидами) приводит к дозозависимому увеличению уровня пролиферации на 50–100%. Было показано, что потенцирующий эффект  $\beta$ -эндорфина на пролиферацию Т-клеток селезенки сопровождается увеличением продукции интерлейкина-2 и дополнительной экспрессией рецепторов к цитокину на поверхности этих клеток. Налоксон не ингибирует стимулирующее действие  $\beta$ -эндорфина, что указывает на неучастие в этом процессе  $\mu$ -,  $\kappa$ -,  $\delta$ - и  $\sigma$ -опиоидных рецепторов. Постоянное присутствие  $\beta$ -эндорфина (или  $\alpha$ -эндорфина) в культуре Т-клеток, которые были предынкубированы с  $\beta$ -эндорфином, полностью отменяет стимулирующий эффект последнего.

Авторы работы [10] предположили, что в отсутствие опиоидных пептидов в среде Т-лимфоциты селезенки крысы экспрессируют только неопиоидные рецепторы к  $\beta$ -эндорфину. Введение в среду  $\beta$ -эндорфина приводит к опосредованному через эти рецепторы увеличению пролиферативного ответа. Дальнейшее длительное присутствие  $\beta$ -эндорфина (или другого опиоидного пептида) в среде культивирования Т-клеток вызывает экспрессию опиоидных рецепторов на их поверхности и подавление пролиферации. Связываясь с опиоидными рецепторами,  $\beta$ -эндорфин ингибирует собственный стимулирующий эффект.

Для доказательства гипотезы о том, что молекула  $\beta$ -эндорфина содержит два разных сайта, один из которых служит для связывания с опиоидными рецепторами, а другой – с неопиоидными, авторы работы [10] изучили влияние на пролиферацию Т-лимфоцитов синтетических фрагментов  $\beta$ -эндорфина 6–31, 18–31, 24–31, 28–31 и 1–27 (пептиды вносили в среду культивирования до стимуляции их митогеном, уровень пролиферации определяли через 72 ч). В результате проведенных исследований было установлено, что пептиды  $\beta$ End-(6–31) и  $\beta$ End-(18–31) увеличивают пролиферацию, причем первый был значительно активнее второго. В то же время фрагменты  $\beta$ End-(1–27),  $\beta$ End-(24–31) и  $\beta$ End-(28–31) были неактивны [11]. На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что для взаимодействия молекулы  $\beta$ -эндорфина с неопиоидными рецепторами Т-клеток селезенки крысы важен участок 6–23; при этом ключевую роль в связывании, вероятно, играет фрагмент 18–23.

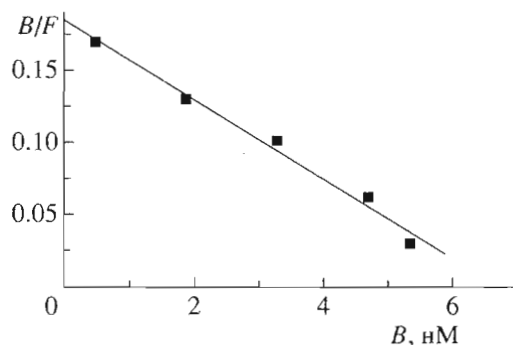


Рис. 5. Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания [ $^{125}$ I]Imn-(6–10)-пептида с Т-лимфоцитами крови человека.

Одновременно эти же авторы показали, что  $\beta$ End-(18–23) увеличивает продукцию интерлейкина-2 и интерлейкина-4 Т-клетками  $CD4^+$ . Таким образом, из всех природных опиоидных пептидов только в молекуле  $\beta$ -эндорфина помимо *N*-концевого пятичленного фрагмента, необходимого для взаимодействия с опиоидными рецепторами, содержится последовательность, обеспечивающая его связывание с рецепторами совершенно иного типа, которые характеризуются нечувствительностью к налоксону и не связывают другие эндогенные опиоидные пептиды.

В данном исследовании эксперименты по ингибированию специфического связывания  $^{125}$ I-меченого  $\beta$ -эндорфина с рецепторами на Т-лимфоцитах показали, что самым коротким активным фрагментом иммунофина является Imn-(6–10)-пептид (рис. 3, кривая 4). Мы получили  $^{125}$ I-меченый аналог этого пептида и изучили его взаимодействие с Т-лимфоцитами. Анализ полученных данных в координатах Скэтчарда показал наличие рецепторов одного класса с  $K_d$  ( $36.3 \pm 0.5$ ) нМ и  $n$   $(4.0 \pm 0.5) \times 10^6$  (рис. 5). Величина неспецифического связывания меченого пептида с клетками составляет 9.8% величины его общего связывания. Следует, однако, отметить, что сродство иммунофина к рецептору на Т-лимфоцитах было в 5 раз выше, чем у Imn-(6–10)-пептида (величина  $K_d$  комплекса [ $^{125}$ I]Imn-(1–10)-рецептор была равна  $7.0 \pm 0.3$  нМ).

Сравнительный анализ способности фрагментов иммунофина конкурировать с  $^{125}$ I-меченым  $\beta$ -эндорфином за связывание с рецепторами на Т-лимфоцитах также показал, что максимальной ингибирующей активностью, а значит и наибольшим сродством к рецептору, обладает иммунофин (таблица). Следует подчеркнуть, что поскольку иммунофин не идентичен, а только на 50% подобен фрагменту  $\beta$ -эндорфин-(10–19), нельзя сделать однозначный вывод о том, что именно этот участок в молекуле гормона обеспечивает его связывание с рецепторами Т-лимфо-



Константы ингибирования различными лигандами специфического связывания  $^{125}\text{I}$ -меченого  $\beta$ -эндорфина (1 нМ) с Т-лимфоцитами из крови здоровых доноров

Лиганд											$K_i^*$ , нМ
Налоксон											>1000
[Met]Enk											>1000
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		(0.6 ± 0.1)
S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	Imn	
Imn-(3-10)											(2.2 ± 0.1)
Imn-(4-10)											(3.4 ± 0.1)
Imn-(5-10)											(8.0 ± 0.2)
Imn-(6-10)											(15.6 ± 0.3)
Imn-(7-10)											>1000
Imn-(8-10)											>1000
Imn-(9-10)											>1000

\* Значения ± SEM (стандартная ошибка среднего) из трех независимых экспериментов.

цитов. Тем более, что приведенные выше результаты изучения влияния фрагментов  $\beta$ -эндорфина на пролиферацию Т-лимфоцитов свидетельствуют о том, что максимальной пролиферативной активностью обладает фрагмент 6-23.

Обращает на себя внимание значительное различие между значениями плотности рецепторов, полученными из графиков Скэтчарда для меченых  $\beta$ -эндорфина, иммунорфина и Imn-(6-10)-пептида. Многолетняя работа с Т-лимфоцитами донорской крови показывает, что их реактивность может варьировать в широких пределах в зависимости от иммунологического статуса донора, который определяется возрастом, полом, наличием скрытых воспалительных процессов и т.д. Поскольку в работе использовалась кровь разных доноров (в каждой серии экспериментов Т-лимфоциты выделяли из крови нового донора), понятно, что уровень экспрессии рецепторов Т-лимфоцитами мог значительно различаться.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали [ $^{125}\text{I}$ -Тур $^{27}$ ]- $\beta$ -эндорфин с удельной активностью 2000 Ки/ммоль (Amersham, Англия); 1,3,4,6-тетрахлор-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -дифенилгликоурил (Йодоген), [Met]Enk,  $\beta$ -эндорфин, налоксон, среду для культивирования клеток RPMI-1640, фетальную сыворотку теленка (Sigma, США); фенилметилсульфонилфторид (PMSF) и  $\text{NaN}_3$  (Serva, ФРГ); L-глутамин и N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновую кислоту (HEPES) (Fluka, Швейцария). Остальные реактивы имели квалификацию "ос. ч.". Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы Milli-Q (Millipore, США).

**Иммунорфин и его фрагменты** были синтезированы методом пентафторфениловых эфиров N-замещенных аминокислот как описано ранее [3]. Чистота пептидов после очистки ВЭЖХ превышала 95%. Молекулярную массу пептидов определяли масс-спектрометрическим методом с ионизацией бомбардировкой ускоренными атомами. Прибор: Vision 2000 (Thermo Bioanalysis, Англия).

**Получение Т-лимфоцитов.** Мононуклеарные клетки из крови здоровых доноров выделяли по методу [12]. Суспензию лимфоцитов разделяли на прилипающую и не прилипающую к подложке фракции на колонке с нейлоновой ватой [13]. Неприлипающую фракцию элюировали средой RPMI-1640, содержащей 5% инактивированной фетальной сыворотки теленка. Полученная фракция содержала Т-лимфоциты и небольшое количество (менее 1%) моноцитов и В-лимфоцитов.

**Реакцию связывания  $^{125}\text{I}$ -меченого  $\beta$ -эндорфина с Т-лимфоцитами** проводили в соответствии со следующей схемой: клетки ( $10^6$ /проба) инкубировали 1 ч при 4°C с меченым пептидом (концентрационный диапазон  $10^{-7}$ – $10^{-11}$  М; три повтора для каждой концентрации) в 1 мл среды RPMI-1640, содержащей 20 мМ  $\text{NaN}_3$  и 10 мМ HEPES, pH 7.5. Затем реакционную смесь из каждой пробирки фильтровали через отдельный стекловолокнистый фильтр GF/A (Whatman, Англия). Фильтры промывали 4 × 5 мл ледяного физиологического раствора, содержащего 10 мМ HEPES, pH 7.5. Радиоактивность на фильтрах подсчитывали с помощью гамма-счетчика (Mini-Gamma Counter, LKB, Швеция). Результаты пяти независимых экспериментов анализировали по методу [14]. Плотность рецепторов ( $n$ ) определяли по формуле:  $R_0 \times$  число Авогадро/количество клеток в 1 л, где  $R_0$  – молярная концентрация рецептора. Величину неспецифического связывания  $^{125}\text{I}$ -меченого  $\beta$ -эндорфина с клетками определяли в присутствии 10 мкМ немеченого образца.

**Для оценки способности иммунорфина и его фрагментов ингибировать специфическое связывание  $^{125}\text{I}$ -меченого  $\beta$ -эндорфина с Т-лимфоцитами** клетки ( $10^6$ /проба) инкубировали с меченым  $\beta$ -эндорфином (1 нМ) и немеченым пептидом (концентрационный диапазон:  $10^{-10}$ – $10^{-6}$  М; три повтора на каждую концентрационную точку) как описано выше. Константу ингибирования ( $K_i$ ) вычисляли по формуле:  $\text{IC}_{50}/(1 + [\beta\text{-End}]/K_d)$  [15], где  $K_d$  – равновесная константа диссоциации комплекса [ $^{125}\text{I}$ ]- $\beta\text{End}$ -рецептор;  $\text{IC}_{50}$  – концентрация немеченого пептида, вызывающая 50%-е ингибирование специфического связывания меченого  $\beta$ -эндорфина. Величину  $\text{IC}_{50}$  определяли графически на основании кривой ингибирования (рис. 3). Значение  $K_d$  вычисляли предварительно как описано выше.

**Иодирование пептидов.** Введение  $^{125}\text{I}$  в иммуноρφин (10 мкг) и в Имн-(6–10)-пептид (10 мкг) проводили по методу [16] с помощью  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (1 мКи) и Йодогена. Удельные активности  $^{125}\text{I}$ -меченых пептидов были равны 232 и 179 Ки/ммоль соответственно.

**Связывание  $^{125}\text{I}$ -меченых иммуноρφина и Имн-(6–10)-пептида с Т-лимфоцитами** проводили в соответствии со следующей схемой: по  $10^6$  клеток в каждой пробирке инкубировали с  $^{125}\text{I}$ -мечеными пептидами (концентрационный диапазон  $10^{-10}$ – $10^{-7}$  М; три повтора для каждой концентрации) в 1 мл среды RPMI-1640, содержащей 10 мМ HEPES, 20 мМ  $\text{NaN}_3$  и RMSF (0.6 г/л), pH 7.4 при 4°C в течение 40 мин. По окончании инкубации реакционную смесь фильтровали через стекловолонистые фильтры GF/A (Whatman, Англия). Фильтры промывали 4 × 5 мл физиологического раствора, содержащего 10 мМ HEPES, pH 7.5. Радиоактивность на фильтрах подсчитывали с помощью гамма-счетчика (Mini-Gamma Counter, ЛКВ, Швеция). Результаты пяти независимых экспериментов анализировали по методу [14]. Величину неспецифического связывания каждого меченого пептида с клетками определяли в присутствии 10 мкМ того же самого немеченого пептида.

Работа выполнена при финансовой поддержке Международного научно-технического центра (грант № 1462).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Julliard J.H., Shibasaki T., Ling N., Guillin 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. Zav'yalov V.P., Zaitseva O.R., Navolotskaya E.V., Abramov V.M., Volodina E.Yu., Mitin Y.V. // *Immunol. Lett.* 1996. V. 49. P. 21–26.
4. Brownstein M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 5391–5393.
5. Singh V.K., Bajpai K., Biswas S., Haq W., Khan M.Y., Mathur K.B. // *Neuroimmunomodulation*. 1997. V. 4. P. 285–297.
6. Gilman S.C., Schwartz J.M., Milner R.J., Bloom F.E., Feldman J.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982. V. 79. P. 4226–4231.
7. Gilmore W., Weiner L.P. // *Immunopharmacol.* 1989. V. 17. P. 19–27.
8. Kusnecov A.W., Husband A.J., Pang G., Smith R. // *Brain Behav. Immun.* 1987. V. 1. P. 88–95.
9. Hemmick L.M., Bidlack J.M. // *J. Neuroimmunol.* 1990. V. 29. P. 239–248.
10. van den Bergh P., Rozing J., Nagelkerken L. // *Immunology*. 1991. V. 72. P. 537–543.
11. van den Bergh P., Rozing J., Nagelkerken L. // *Immunology*. 1993. V. 79. P. 18–23.
12. Boyum A. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968. V. 21 (Suppl. 97). P. 77–90.
13. Aman P., Ehlin-Henriksson B., Klin G. // *J. Exp. Med.* 1984. V. 159. P. 208–220.
14. Chang K.-J., Jacobs S., Cuatrecasas P. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1975. V. 406. P. 294–303.
15. Chang Y.C., Prusoff W.H. // *Biochem. Pharmacol.* 1973. V. 22. P. 3099–3108.
16. 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.

## The Interaction of Synthetic Decapeptide SLTCLVKGFY with Human T Lymphocytes

E. V. Navolotskaya\*<sup>#</sup>, N. V. Malkova\*, T. N. Lepikhova\*, S. B. Krasnova\*,  
T. A. Zargarova\*, V. P. Zav'yalov\*\*<sup>#</sup>, and V. M. Lipkin\*

\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (Pushchino Branch), Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 6, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

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

The synthetic peptide SLTCLVKGFY, corresponding to the 364–373 amino acid sequence of the human IgG heavy chain (Immunorphin), was found to compete with [ $^{125}\text{I}$ ]  $\beta$ -endorphin for binding by high-affinity receptors on T lymphocytes isolated from the blood of healthy donors ( $K_i$  0.6 nM). The fragments 3–10, 4–10, 5–10, and 6–10 of Immunorphin also inhibited the binding ( $K_i$  2.2, 3.4, 8.0, and 15 nM, respectively). Specificity of these receptors was studied: they turned out to be insensitive to naloxone and, therefore, are not opioid. The  $K_d$  values of the specific binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled Immunorphin and its 6–10 fragment to the receptor were found to be 7.4 and 36.3 nM, respectively. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* IgG, opioid peptides, opioid receptors, T lymphocytes

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (27) 73-0893; fax: +7 (0967) 79-0527; e-mail: navolots@fibkh.serpukhov.su.