



ПИСЬМА
РЕДАКТОРУ

УДК 577.112:577.29

НУКЛЕАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА-10 ЧЕЛОВЕКА

© 2002 г. С. М. Драницына, И. А. Костянян[#], М. В. Астапова, Е. А. Суряна, В. М. Липкин

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997
ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

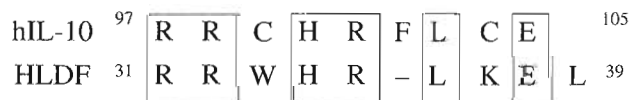
Поступило в редакцию 30.07.2001 г. Принято к печати 31.07.2001 г.

На основании структурной гомологии участка (97–105) интерлейкина-10 человека с ДНК/РНК-гидролизующим фрагментом эндогенного фактора дифференцировки клеток промиелоцитарного лейкоза человека линии HL-60 (HLDF) высказано предположение о возможной нуклеазной активности этого иммуносупрессирующего цитокина. Показано, что рекомбинантный интерлейкин-10 человека (rhIL-10) способен расщеплять все формы плазмидной ДНК. Выдвинута гипотеза о роли интерлейкина-10 в индукции апоптоза моноцитарных клеток.

Ключевые слова: клетки HL-60; фактор дифференцировки HLDF; нуклеазная активность; интерлейкин-10; интерлейкин-1β; апоптоз.

Ранее из среды культивирования клеток HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека был выделен и охарактеризован эндогенный фактор HLDF, индуцирующий дифференцировку исходных клеток по гранулоцитарному пути [1]. При исследовании механизма действия HLDF было обнаружено, что помимо дифференцирующей активности он обладает также свойствами неспецифической нуклеазы [2]. Нами был идентифицирован 8-членный фрагмент фактора (HLDF-8), обуславливающий способность HLDF расщеплять мРНК, линейную ДНК фага λ, все формы плазмидной ДНК. Мы обнаружили, что последовательности, гомологичные HLDF-8, встречаются у ряда ДНК/РНК-связывающих либо гидролизующих ферментов [2].

Неожиданным оказался тот факт, что последовательность, высоко гомологичная HLDF-8, была обнаружена и у интерлейкина-10 человека (97–105).



IL-10 – природный цитокин, продуцируемый моноцитами, макрофагами, Т- и В-клетками, является эффективным супрессором синтеза и секреции медиаторов воспалительного ответа (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8) активированными моноцитами и макрофагами [3]. Он обнаружен в организме человека, мыши, крысы, свиньи. Кроме того, аминокислотная последовательность белка BCRF1 виру-

са Epstein-Barr имеет 84% подобия с последовательностью hIL-10 [4].

Исходя из наличия в hIL-10 участка (97–105), подобного по структуре HLDF-8, мы предположили, что этот природный иммуносупрессирующий цитокин может обладать нуклеазной активностью. В пользу этой гипотезы также свидетельствует тот факт, что в состав этого фрагмента входят остатки двухосновной аминокислоты Glu и His, что характерно для активных центров неспецифических эндонуклеаз.

Мы показали, что после инкубации в течение 1 ч ДНК плазмиды pSp65 с рекомбинантным IL-10 человека (10⁻⁶ М) в кислых условиях (рН 4.5) при 37°C на электрофореграммах в 1% агарозном геле, импрегнированном бромистым этидием, наблюдается полное исчезновение всех трех форм плазмидной ДНК: суперскрученной, кольцевой с одноцепочечным разрывом и линейной (рис. 1). При нейтральных значениях рН эффективность процесса значительно ниже. На электрофореграммах не обнаруживаются продукты деградации, характерные для расщепления ДНК неспецифическими ДНКазами (так называемый smear). Полученные данные косвенно подтверждают ранее высказанное нами утверждение [2], что расщепление нуклеиновых кислот пептидами, имеющими гомологию с HLDF-8, происходит по механизму, отличному от механизма действия известных нуклеаз.

Известно, что при культивировании свежeweделенных моноцитов из периферической крови человека в бессывороточной среде в отсутствие цитокинов (TNF-α и IL-1β), поддерживающих выживание клеток, происходит их спонтанный быстрый апоптоз [5]. Шмидт и сотрудники обнаружили, что внесение IL-10 (10–100 МЕ/мл) в среду

Сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин; HLDF – фактор дифференцировки клеток линии HL-60; rhIL-10 – рекомбинантный интерлейкин-10 человека.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 336-55-11; факс: (095) 336-61-66; эл. почта: iakost@mail.ibch.ru).

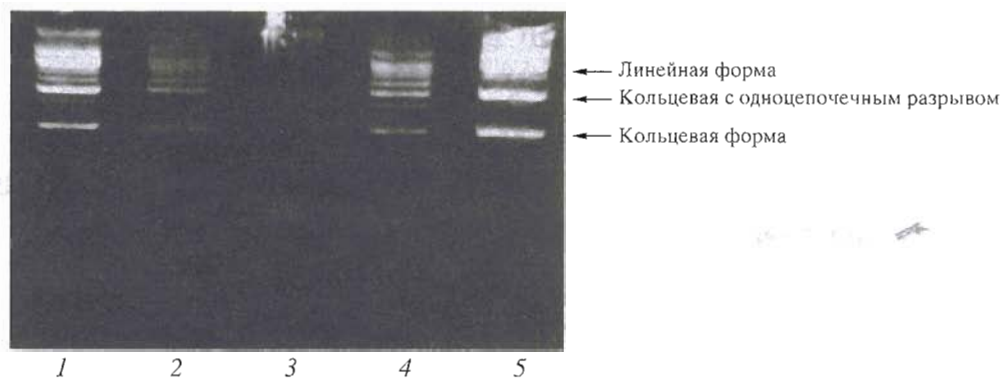


Рис. 1. Анализ нуклеазной активности rhIL-10 на ДНК плазмиды pSp65 с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Плазмидную ДНК (0.5 мкг) инкубировали в течение 1 ч при 37°C в 10 мкл реакционной смеси с рН 7.5 (1, 2) или с рН 4.5 (3, 4) в присутствии 10^{-9} М rhIL-10 (2, 3) или в его отсутствие (1, 4); 5 – исходная плаزمида. Буфер рН 7.5 – 10 мМ Трис-НСl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ DTE, 0.1% BSA; рН 4.5 – 50 мМ AcONH₄, 5 мМ MnCl₂, 0.1% BSA.

культивирования моноцитов приводит к увеличению в 2 раза числа аннексинопозитивных клеток в культуре [6]. Дополнительные исследования клеток, морфологически измененных под действием IL-10, методами электронной микроскопии, TUNEL-анализом (основанным на включении в клетки флуоресцентномеченных нуклеотидов по местам одноцепочечных разрывов в ДНК с помощью терминальной dT-трансферазы) и электрофоретическим анализом фрагментации клеточной ДНК позволили авторам сделать вывод об участии IL-10 в индукции апоптоза неактивированных моноцитов.

Мы предположили, что способность IL-10 индуцировать апоптоз определяется нуклеазной ак-

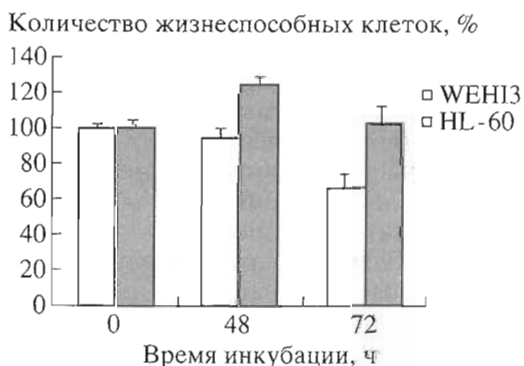


Рис. 2. Влияние rhIL-10 (10^{-9} М) на пролиферацию клеток WEN13 и HL-60. Клетки HL-60 и WEN13 культивировали в среде RPMI 1640 с 10% фетальной сывороткой. Клетки, находящиеся в lag-фазе обрабатывали rhIL-10. Через 48 и 72 ч отбирали аликвоты (200 мкл) и помещали в 96-луночную планшетку, обработанную poly(L-Lys), после чего проводили МТТ-тест по стандартной процедуре [7]. Количество живых клеток определяли по способности МТТ проникать в митохондрии и оценивали по поглощению при 540 нм с помощью Multiskan MCC/340 (Labsystem, Финляндия). Полученные результаты обрабатывали по методу [8].

тивностью этого цитокина. Для проверки этой гипотезы, мы проинкубировали в присутствии rhIL-10 (10^{-9} М) (72 ч) клетки двух миелоцитарных линий: линии миеломоноцитов WEN13 и менее дифференцированной промиелоцитарной линии HL-60. Выбор клеток обусловлен тем фактом, что апоптоз, индуцированный IL-10, описан только для моноцитов (но не для макрофагов, Т- и В-клеток), культивируемых в присутствии этого цитокина [5].

Проведенный нами МТТ-тест (способность живых клеток к включению бромидра 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия в митохондрии) показал, что обработка rhIL-10 (72 ч) клеток WEN13 приводит к снижению количества жизнеспособных клеток в культуре на $30 \pm 6\%$ (рис. 2). При этом в них происходит деградация ДНК, что было подтверждено с помощью TUNEL-анализа (данные не представлены).

Прямо противоположный эффект rhIL-10 был обнаружен в отношении клеток HL-60. Добавление этого цитокина в культуральную среду приводит через 48 ч к увеличению пролиферации клеток на $25 \pm 5\%$. К 72 ч эффект постепенно снижается, причем число апоптотических клеток по сравнению с контролем не изменяется (подтверждено TUNEL-анализом).

Возможно, одной из причин, объясняющей противоположные эффекты IL-10 на клетки этих двух линий, является различие в наборах их поверхностных маркеров (рецепторов), благодаря чему IL-10, взаимодействуя с ними, запускает два разных каскада биохимических процессов [9, 10]. Хотя нельзя исключить, что отсутствие индукции апоптоза в клетках HL-60 связано с высоким уровнем содержания в них мРНК IL-1 β [11]. Накапливаясь в среде культивирования клеток HL-60, этот цитокин может препятствовать действию IL-10. В клетках же WEN13, как и в неактивированных моноцитарных клетках, детектируемый

уровень IL-1 β наблюдается только после их индукции воспалительными агентами, такими, как TNF- α и липополисахариды [12].

Изучение молекулярного механизма действия IL-10 на клетки HL-60 и WENIЗ будет предметом нашего дальнейшего исследования.

Таким образом, на основании полученных результатов, можно предположить, что противовоспалительное действие IL-10 связано как с его прямым ингибирующим эффектом на транскрипцию генов белков воспалительного ответа в моноцитах и макрофагах [13], так и со способностью вызывать апоптоз в этих клетках за счет присущей ему нуклеазной активности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Костанян И.А., Астапова М.И., Старовойтова Е.В., Драницына С.М., Липкин В.М. // Биоорганич. химия. 1995. Т. 21. С. 243–248.
2. Драницына С.М., Костанян И.А., Андреева С.Г., Астапова М.В., Бабиченко И.И., Баева О.В., Богачук А.П., Молотковская И.М., Родионов И.Л., Смирнова Е.В., Липкин В.М. // Биоорганич. химия. 2000. Т. 26. С. 340–351.
3. Pretolani M., Goldman M. // Immunol. Today. 1997. V. 18. P. 277–280.
4. Gesser B., Leffers H., Jinquan T., Vesergaard C., Kirstein N., Sindet-Pedersen S., Jensen S., Thestrup-Pedersen K., Larsen C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 14620–14625.
5. Mangan D., Welch G., Wahl S. // J. Immunol. 1991. V. 146. P. 1541–1546.
6. Schmidt M., Luger N., Pauls H., Schulze-Osthoff K., Domschke W., Kucharzik T. // Eur. J. Immunol. 2000. V. 30. P. 1769–1777.
7. Huet O., Petit J., Ratinaud M., Julien R. // Cytometry. 1992. V. 13. P. 532–539.
8. Chang K.J., Jacobs S., Cuatrecasas P. // Biochim. Biophys. Acta. 1975. V. 406. P. 294–303.
9. Tomimori Y., Ikawa Y., Oyaizu N. // Immunology Letts. 2000. V. 71. P. 49–54.
10. Dokka S., Shi X., Leonard S., Wang L., Castranova V., Rojanasakul Y. // Am. J. Physiol. Lung. Cell. Moll. Physiol. 2001. V. 280. P. 1196–1202.
11. Астапова М.В., Липкин В.М., Архипова М.В., Андреева С.Г., Драницына С.М., Меркулова М.И., Нуриева Р.И., Наволоцкая Е.В., Костанян И.А. // Биоорганич. химия. 1999. Т. 25. С. 816–820.
12. Seymour R., Henderson B. // IMA J. Math. Appl. Med. Biol. 2001. V. 18. P. 159–192.
13. Wang P., Wu P., Siegel M., Egan R., Billah M. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 9558–9563.

Nuclease Activity of Human Interleukin-10

S. M. Dranitsyna, I. A. Kostanyan[#], M. V. Astapova, E. A. Surina, and V. M. Lipkin

[#]Phone: +7 (095) 336-5511; fax: +7 (095) 336-6166; e-mail: iakost@mail.ibch.ru

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

The nuclease activity of human interleukin-10, an immunosuppressive cytokine, was predicted on the basis of structural homology between the 97–105 sequence of human interleukin-10 and the DNA/RNA-hydrolyzing fragment of the endogenous differentiation factor for the HL-60 line of human promyelocyte leukemia cells. The human recombinant interleukin-10 was shown to cleave all forms of plasmid DNA. The role of interleukin-10 in the apoptosis induction in monocytic cells was hypothesized. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: apoptosis, HL-60 cells, differentiation factor HLDF, interleukin-1 β , interleukin-10, nuclease activity