



УДК 577.112.6.088.6

СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ МУРАМИЛПЕПТИДОВ С МЕМБРАНАМИ МОЗГА КРЫСЫ

*Гайдалов А. А., Уткин Ю. Н., Андропова Т. М.,
Цетлин В. И., Иванов В. Т.*

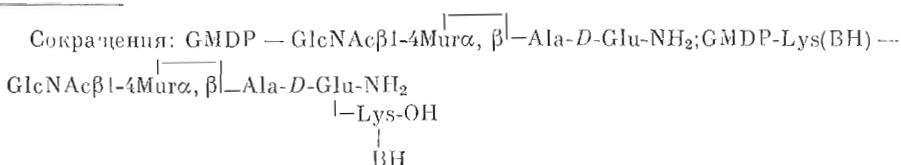
*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Синтезирован трипептидный аналог N-ацетилглюкозаминил-(β 1-4)-N-ацетилмурамилдипептида (GMDP), содержащий C-концевой остаток Lys (GMDP-Lys), в результате реакции которого с N-гидроксисукцинимидным эфиром 3-(4-гидроксифенил)-пропионовой кислоты и последующего иодирования получено ¹²⁵I-меченое производное с уд. акт. ~2000 Кп/ммоль. Показано, что это соединение специфически связывается с мембранами мозга крысы: константа диссоциации $K_d = 3,1 \pm 0,9$ нМ, число связывающих участков $B_{max} = 11,0 \pm 1,2$ фмоль/мг белка. Связывание ингибируется нерадиоактивным иодированным производным, немодифицированным GMDP-Lys и GMDP. Таким образом, впервые показано наличие специфического связывания иммуноактивных мурамилпептидов с мозгом.

Мурамилпептиды, являющиеся фрагментами клеточных стенок бактерий, обладают иммуностимулирующей активностью, что обуславливает важное практическое значение этих препаратов, а также их соответствующих синтетических аналогов [1, 2]. Вместе с тем мурамилпептиды подобно биологически активным пептидам других классов характеризуются наличием также других видов активности. Так, было показано, что мурамилдипептид (MDP) и его аналоги, содержащие N-ацетилглюкозамин, увеличивают амплитуду и продолжительность низкочастотных колебаний на электроэнцефалограмме животных и поэтому могут рассматриваться как эндогенные сомногенные факторы [3, 4]. Кроме того, известно, что мурамилпептиды обладают пирогенными свойствами, указывающими на их действие на центральную нервную систему [5]. Перечисленные виды активности предполагают наличие в мозге специфической мишени (возможно, рецептора). Однако биохимические данные, характеризующие участки связывания мурамилпептидов в мозге, отсутствуют.

Задачей настоящей работы являлось обнаружение в мозге крысы участков специфического связывания одного из представителей мурамилпептидов — N-ацетилглюкозаминил-(β 1-4)-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина (GMDP), иммуностимулирующие свойства которого ранее были детально изучены в нашем институте [6, 7]. Для этой цели синтезирован аналог GMDP, содержащий C-концевой остаток Lys (GMDP-Lys) и позволяющий ввести радиоактивный изотоп ¹²⁵I с помощью метода Болтона — Хантера [8].

GMDP-Lys получен по методу [9] в результате конденсации незащищенного дисахарида — N-ацетилглюкозаминил-(β 1-4)-N-ацетилмурамовой кислоты — с трифторацетатом трипептида L-Ala-D-Glu(-L-Lys)-NH₂ и последующего деблокирования и очистки. Как показала высокоэффективная жидкостная хроматография на колонке с обращенной фазой



Реактив Болтона — Хантера (BH) — $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COONSu}$.

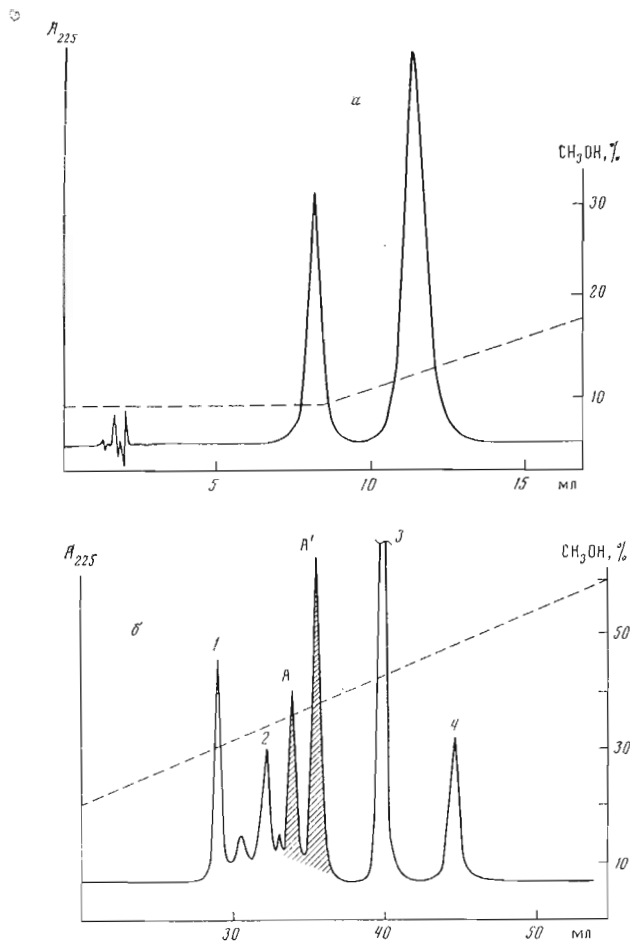


Рис. 1. Разделение изомеров GMDP-Lys (а) и продуктов модификации GMDP-Lys реагентом ВН (б) на колонке Ultrasphere-ODS (0,46×25 см), элюция 0,1% аммоний-трифторацетатным буфером, рН 3,5, в градиенте концентрации метанола от 10 до 60%. Скорость элюции 1 мл/мин. Пики А и А', соответствующие GMDP-Lys(BH), отмечены штриховкой

(рис. 1а), полученное соединение элюируется в виде двух пиков с постоянным отношением интенсивностей. Эта особенность обусловлена наличием двух аномеров по свободному гликозидному гидроксилу. Подобно GMDP полученный аналог обладает разнообразными видами активности — иммуностимулирующей, способностью вызывать некроз и ингибировать рост опухолей [7]. Сомногенная активность GMDP-Lys нами не исследована, однако имеющиеся в литературе данные как для GMDP [4], так и для MDP-Lys [3] позволяют думать, что GMDP-Lys также обладает сомногенной активностью и, следовательно, должен иметь специфическую мишень в мозге.

Обработка GMDP-Lys N-оксисукцинимидным эфиром 3-(4-гидроксифенил)пропионовой кислоты (ВН) и последующее разделение реакционной смеси методом ВЭЖХ на обращенной фазе (рис. 1б) приводят к появлению группы пиков, элюирующихся при более высоких концентрациях метанола, чем нативный GMDP-Lys. Контрольные эксперименты позволили предположить, что пики А и А' соответствуют аномерам модифицированного GMDP-Lys, а пик 3 — оставшемуся реагенту ВН (пики 1, 2 и 4 — неидентифицированные фракции). Фракция А и А' содержат, по данным УФ-спектроскопии, гидроксифенильную группировку (максимальное поглощение при 276 нм). Хроматография каждой из этих фракций давала пики А и А' с одинаковым для обоих случаев соотно-

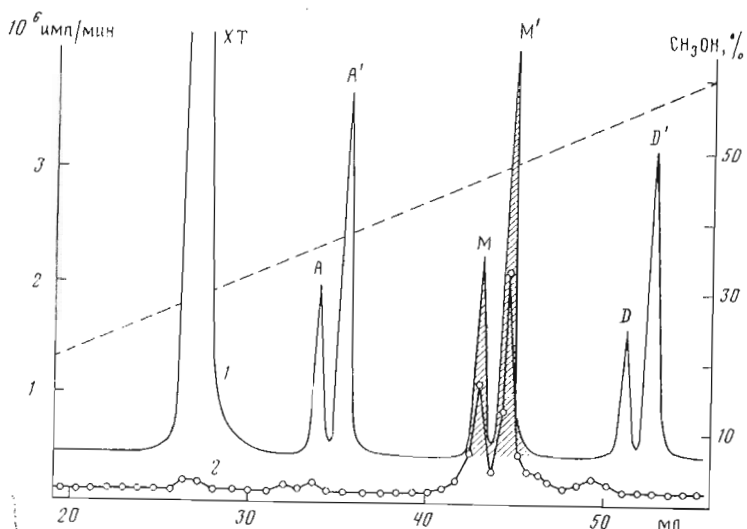


Рис. 2. Разделение продуктов иодирования GMDP-Lys(BH). Колонка Ultrasphere-ODS (0,46×25 см), элюция 0,1% аммоний-трифторацетатным буфером, pH 3,5, в градиенте концентрации метанола от 10 до 60%. Скорость элюции 1 мл/мин. Контроль по поглощению при 225 нм (1) и по радиоактивности (2). XT — пик, отвечающий хлорамину Т

шением интенсивностей. На основании этих данных был сделан вывод о том, что выделенные фракции соответствуют аномерам модифицированного гликопептида (GMDP-Lys(BH)).

Для поиска оптимальных условий реакции иодирования и разделения продуктов реакции был осуществлен синтез иодпроизводных GMDP-Lys-(BH) с использованием хлорамша Т (XT) и нерадиоактивного NaI. В результате иодирования и последующего разделения смеси методом ВЭЖХ на обращенной фазе образуются две пары пиков, М и D, выходящих при более высоких концентрациях метанола, чем пики А и А', отвечающие исходному соединению (рис. 2). Увеличение содержания NaI в реакционной смеси приводит к возрастанию интенсивности пары пиков D и уменьшению интенсивности пары пиков А. При титровании растворов фракций М и D щелочью наблюдается bathochромный сдвиг максимумов спектров поглощения от 280 нм при pH 2 до 310 нм при pH 9 для пика М и от 282 нм при pH 2 до 316 нм при pH 9 для пика D. Эти значения соответствуют максимумам поглощения моноиод- и диоди-тирозина [10]. Полученные данные свидетельствуют о том, что пики М представляют собой моноиодпроизводное GMDP-Lys(BH), а пики D — диодипроизводное. Для получения производного с высокой удельной радиоактивностью при тех же условиях реакции использовался неразбавленный препарат Na¹²⁵I (0,5 мКи), что соответствовало значительному избытку GMDP-Lys(BH) в реакционной смеси. Образующееся в результате реакции с радиоактивным Na¹²⁵I соединение элюировалось на месте выхода пика М и, следовательно, является монопроизводным исследуемого лиганда. Таким образом, было получено радиоактивно меченное моно-[¹²⁵I]производное GMDP-Lys(BH) с удельной радиоактивностью ~2000 Ки/ммоль.

Это соединение проявляло способность связываться с мембранами мозга крысы. Величина специфического связывания вычислялась как разность между общим связыванием (количество радиоактивности на фильтре при инкубации с GMDP-Lys([¹²⁵I]BH) в отсутствие нативного GMDP-Lys) и неспецифическим связыванием (количество радиоактивности на фильтре при инкубации в присутствии 10 000-кратного избытка GMDP-Lys).

Для подбора оптимальных условий анализа связывания была определена зависимость специфического связывания радиоактивного производного с мембранами от времени инкубации. Поскольку насыщение дости-

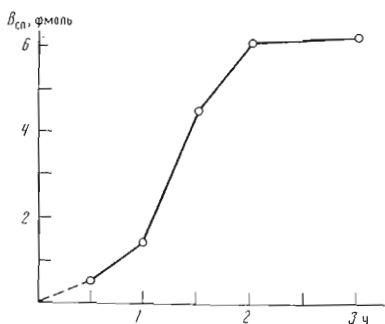


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость специфического связывания GMDP-Lys($[^{125}\text{I}]\text{BH}$) с мембранами от времени инкубации. Концентрация лиганда 4 нМ, мембран 4 мг/мл (по белку). Объем пробы 250 мкл

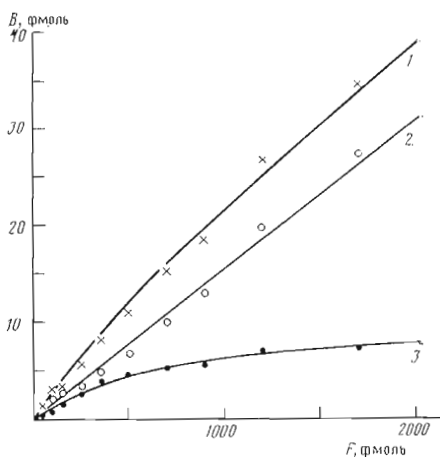


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость общего (1), неспецифического (2) и специфического (3) связывания от количества GMDP-Lys($[^{125}\text{I}]\text{BH}$) (F). Концентрация мембран 4 мг/мл (по белку). Объемы пробы 250 мкл. Время инкубации 2 ч

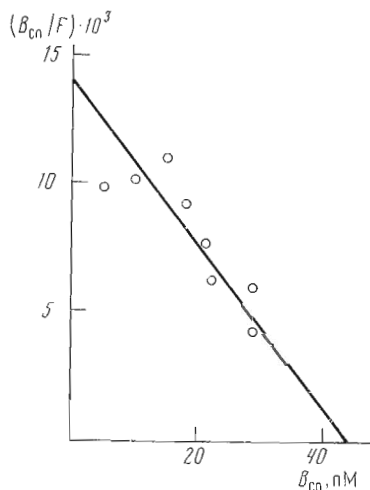


Рис. 5

Рис. 5. График связывания в координатах Скэтчарда

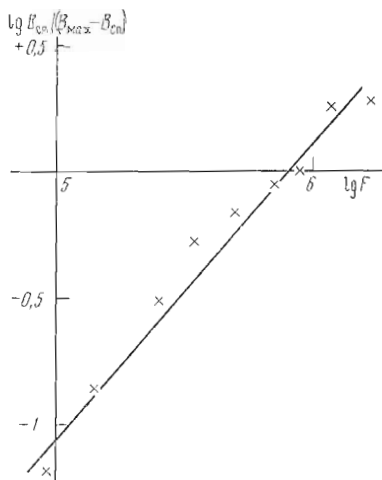


Рис. 6

Рис. 6. График связывания в координатах Хилла ($B_{\text{сп}}$ и B_{max} в фемтомолях, F — в имп./млн)

гается примерно через 2 ч (рис. 3), последующие эксперименты проводились при 2-часовой инкубации при комнатной температуре.

Имеющиеся в литературе данные по электроэнцефалографическому (ЭЭГ) исследованию сомногенного действия мурамилпептидов свидетельствуют о замедленном характере взаимодействия их с мозгом животных [5]. Так, при 10-часовом эксперименте по введению в мозг крысы раствора MDP (общая доза 2,5 нмоль) существенное усиление низкочастотных колебаний (δ -волн сна), а также повышение температуры мозга наблюдалось лишь через 4–5 ч после начала введения. Эти данные коррелируют с фактом замедленного характера взаимодействия GMDP-Lys($[^{125}\text{I}]\text{BH}$) с мембранами мозга крысы.

При изучении зависимости специфического связывания от концентрации лиганда была получена выходящая на плато насыщения кривая (рис. 4). Построение графика связывания в координатах Скэтчарда (рис. 5) позволило определить константу диссоциации лиганд-рецептор-

ного комплекса ($K_a=3,1\pm 0,9$ нМ) и количество участков связывания ($B_{\max}=11,0\pm 1,2$ фемоль/мг). По графику, построенному в координатах Хилла (рис. 6), найден коэффициент Хилла ($h=1,14$), что говорит о наличии одного класса связывающих участков.

Таким образом, можно сделать вывод, что соединение, полученное в результате модификации GMDP-Lys методом Болтона — Хантера и иодирования, специфически и с насыщением связывается с мембранами мозга крысы. При добавлении 10 000-кратных избытков GMDP-Lys, GMDP-Lys(BI) или GMDP наблюдалась примерно одинаковая степень подавления специфического связывания, из чего можно заключить, что специфичность взаимодействия практически не меняется при модификации. При добавлении 10 000-кратного избытка серотонина не наблюдалось подавления специфического связывания, что указывает на различие связывающих участков серотонина и мурамилпептидов.

Крайне низкое число мест связывания ($11,0\pm 0,9$ фемоль/мг) может объясняться тем, что для выделения мембран использовался гомогенат целого мозга, в то время как рецепторсодержащие области мозга, возможно, немногочисленны и строго локализованы. Это предположение подтверждается ЭЭГ-данными работы [11], свидетельствующими, что участки мозга кроликов, ответственные за связывание MDP, локализованы в области основания переднего мозга на уровне оптической хиазмы и соединения со средним мозгом.

В настоящее время известен ряд эндогенных факторов, проявляющих сомногенную активность при различных способах введения в организм животных [12]: кроме рассматривавшихся в данной работе мурамилпептидов это пептид δ -сна (DSIP) [5], простагландин D_2 [5], интерлейкин-1 [13]. О природе рецепторов этих соединений в центральной нервной системе сведения практически отсутствуют. В случае DSIP продемонстрировано наличие специфического связывания с мозгом, однако величина константы диссоциации ($K_a=14$ мкМ) [14] характеризует участки сравнительно низкого сродства.

С другой стороны, в ряде работ [15, 16] было показано наличие специфических центров связывания мурамилпептидов на их «основных» мишенях — макрофагах. Конкуренция за связывание с этими клетками серотонина [15] указывает на то, что рецепторы серотонина по крайней мере отчасти могут быть вовлечены во взаимодействие мурамилпептидов с макрофагами. В то же время отсутствие подобной конкуренции за связывание с мембранами мозга, наблюдавшееся в данной работе, указывает на возможное различие мурамилпептидсвязывающих участков на мембранах мозга и макрофагах. Интересно, что опубликованные недавно величины $K_a=1$ нМ для связывания MDP-Lys с макрофагами [16] близки к полученной нами величине $K_a=3$ нМ, характеризующей связывание GMDP-Lys с мозгом крысы.

По-видимому, дальнейшие исследования позволят более детально охарактеризовать сходство и различие связывающих центров мурамилпептидов в клетках мозга и иммунной системы.

Экспериментальная часть

В работе использовали N-гидроксисукцинимидный эфир 3-(4-гидроксифенил)пропионовой кислоты (Fluka), хлорамин T, бычий сывороточный альбумин (BSA) (Serva) и $Na^{125}I$ («Изотоп»). Разделение веществ проводилось на хроматографе модели Altex 332 (Beckman), спектры поглощения снимали на спектрофотометре Hitachi 220 A.

Синтез GMDP-Lys. Трипептид Boc-Ala-D-Glu(-Lys(Z)-OBzl)-NH₂ [17] обрабатывали 70% водной трифторуксусной кислотой в течение 0,5 ч для удаления Boc-группы и конденсировали с дисахаридом, N-ацетилглюкозаминил-(β 1-4)-N-ацетилмурамовой кислотой, по методике [9]. Защищенный гликопептид очищали с помощью последовательной хроматографии на DEAE-сефадекс А-25 и CM-сефадекс С-25. Деблокирование проводили гидролизом над Pd-чернью в 75% уксусной кислоте в течение 3 ч. Выход 30%, $[\alpha]_D^{20} = -6,8$ (с 0,5, H₂O). $T_{пл} 169^\circ C$. Строение полученного вещества доказано данными аминокислотного и аминокислотного анализа (соотношение Glc — Mur — Ala — Glu — Lys=0,83 : 1,00 : 1,10 : 1,04 : 0,96), гомогенность показана

ВЭЖХ на обращенной фазе (рис. 1а). По данным масс-спектрографии с бомбардировкой быстрыми атомами, 95% вещества имеет молекулярную массу M_r 824, что соответствует протонированной форме GMDP-Lys.

Модификация GMDP-Lys реагентом Болтона — Хантера. К 200 мкл Na-боратного буфера, pH 8,5, добавляли раствор, содержащий 2 мг (2,2 мкмоль) GMDP-Lys в 200 мкл воды, а затем 1,5 мг (5,8 мкмоль) реагента в 150 мкл метанола. После инкубации в течение 30 мин при 20° С смесь разделяли на колонке Ultrasphere-ODS в градиенте концентрации метанола (рис. 1б).

GMDP-Lys($[^{125}I]BH$). К 15 мкл 0,25 М Na-фосфатного буфера, pH 7,5, добавляли 45 мкг (40 нмоль) GMDP-Lys(BH) в 15 мкл 0,05 М Na-фосфатного буфера (pH 7,5), 0,5 мКи Na ^{125}I (2000 Ки/ммоль) в 4 мкл воды, 150 мкг (535 нмоль) хлорамина Т в 15 мкл 0,05 М Na-фосфатного буфера, pH 7,5, и через 1 мин 200 мкг (1000 нмоль) Na $_2$ S $_2$ O $_5$ в 20 мкл того же буфера. Через 1 мин смесь разделяли на колонке Ultrasphere-ODS (рис. 2). Для дальнейших опытов использовалась фракция M', содержащая радиоактивный лиганд в более высокой концентрации.

Для получения препарата лизированных мембран из мозга крысы использовалась методика [18]. Полученный в последнем центрифугировании осадок мембран ресуспендировали в буфере А (25 мМ MOPS-KOH, pH 7,4; 1 мМ MgSO $_4$). Суспензию мембран замораживали и хранили при -70° С. Содержание белка в суспензии мембран определяли по методу Петерсена [19].

Анализ связывания GMDP-Lys($[^{125}I]BH$) с мембранами. К 250 мкл суспензии мембран (4 мг белка/мл) в буфере А с 0,1% BSA добавляли возрастающие количества радиоактивного лиганда. В контрольную пробу вносили, кроме того, 10 000-кратный избыток GMDP-Lys. После инкубации в течение 2 ч при 20° С смесь пропускали через фильтры GF/F (Whatman), предварительно выдержанные 12 ч при 4° С в буфере А с 1% BSA для уменьшения уровня неспецифического связывания; каждый фильтр после фильтрации промывался 3 раза по 3 мл буфера А с 0,1% BSA. Радиоактивность фракций и фильтров определяли на сцинтилляционном γ -счетчике Intertechnik. Данные обрабатывали по методу наименьших квадратов и на основании полученных кривых рассчитывали K_d , B_{max} и h , как описано в работе [20].

Авторы выражают благодарность Е. П. Добрушкиной за помощь в синтезе GMDP-Lys.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chedid L., Audibert F., Lefrancier P., Choay J., Lededer E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. № 7. P. 2472-2475.
2. Bezrukov M. V., Reshetova O. S., Rozynov B. V., Gavrilov Ya. D., Kozmin S. A., Astarova M. V., Barkova T. I., Andronova T. M., Ivanov V. T. // Chemistry of peptides and proteins. V. 3/Eds Voelter W., Bayer E., Ovchinnikov Y. A., Ivanov V. T. B.— N. Y.: Walter de Gruyter & Co., 1986. P. 85-98.
3. Krueger J. M., Pappenheimer J. R., Karnovsky M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 19. P. 6102-6106.
4. Ковальзон В. М., Андропова Т. М. // Тезисы IX Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы. 1983. С. 64.
5. Inoue S., Honda K., Kotoda Y., Uchizono K., Ueno R., Hayaishi O. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 19. P. 6240-6244.
6. Ростовцева Л. И., Андропова Т. М., Малькова В. П., Сорокина И. Б., Иванов В. Т. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 12. С. 1843-1858.
7. Andronova T., Bezrukov M., Yurovskaya A., Ulyashin V., Sorokina I., Ivanov V. // Proc. of the 18-th Eur. peptide symposium. 1984. P. 258-288.
8. Bolton A. E., Hunter W. M. // Biochem. J. 1973. V. 133. № 2. P. 529-539.
9. Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Ростовцева Л. И., Андропова Т. М., Сорокина И. Б., Малькова В. П. Гликопептиды, обладающие противопухольевой активностью, и способ их получения: А. с. 727647 // Б. И. 1980. № 14.
10. Gemill C. L. // Arch. Biochem. and Biophys. 1955. V. 54. № 1. P. 359-365.
11. Garsia-Ararras J. E., Pappenheimer J. R. // J. Neurophysiol. 1983. V. 49. P. 528-533.
12. Inoue S. // Proceedings of Taniguchi symposia on brain sciences № 8. 1985. № 1. P. 3-12.
13. Krueger J. M., Walter J., Dinarello C. A. // Amer. J. Physiol. 1984. V. 246. P. 994-999.
14. Van Disk A. M. A., Schoenenberger G. A. // Proceedings of Taniguchi symposia on brain sciences № 8. 1985. № 14. P. 167-178.
15. Silverman D. H. S., Karnovsky M. L. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 131. № 3. P. 1160-1167.
16. Silverman D. H. S., Krueger J. M., Karnovsky M. L. // J. Immunol. 1986. V. 136. № 6. P. 2195-2201.
17. Kusumoto S., Tarumi Y., Ikenaka K., Shiba T. // Bull. Chem. Soc. Japan. 1976. V. 49. P. 533-539.
18. Cascieri M. A., Liang T. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 8. P. 5158-5164.
19. Peterson G. L. // Anal. Biochem. 1977. V. 83. № 2. P. 346-356.
20. Munson P. J., Rodbard D. // Anal. Biochem. 1980. V. 107. № 1. P. 220-239.

Поступила в редакцию
1.VI.1987

SPECIFIC BINDING
OF MURAMYL PEPTIDES TO RAT BRAIN MEMBRANES
KAYDALOV A. A., UTKIN Yu. N., ANDRONOVA T. M., TSETLIN V. I.,
IVANOV V. T.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

A tripeptide analogue of N-acetylglucosaminyl-(β 1-4)-N-acetylmuramyl dipeptide (GMDP) which contains C-terminal Lys residue (GMDP-Lys) was prepared. Its reaction with N-hydroxysuccinimidyl 3-(4-hydroxyphenyl)propionate (BH) followed by iodination gave the ^{125}I -labelled derivative with specific activity ca. 2000 Ci/mmol. This compound was shown to bind specifically with rat brain membranes, dissociation constant $K_d=3,1\pm 0,9$ nM, binding capacity $B_{\max}=11,0\pm 1,2$ fmol/mg protein. Binding was inhibited by the non-radioactive iodinated derivative, unmodified GMDP-Lys and GMDP. Thus, the specific binding of immunoactive myramyl peptides with brain has been demonstrated for the first time.