



УДК 577.1.083.3

## ПОЛИПЕПТИДЫ ИЗ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШИ, УЗНАЮЩИХ ГЛЮКОЗАМИНИЛМУРАМОИЛДИПЕПТИДЫ

© 1995 г. Т. Н. Головина, М. В. Сумарока, Л. В. Самохвалова,  
Ю. В. Шебзухов, Е. А. Макаров, В. А. Несмеянов\*

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 07.04.94 г. После доработки 06.06.94 г.

С использованием радиолигандного анализа показано, что на поверхности перитонеальных макрофагов мыши имеется несколько сотен высокоаффинных GMDP-связывающих центров с константой связывания 350 пМ. Методом фотоаффинного мечения внутри перитонеальных макрофагов мыши обнаружены белки с молекулярными массами 32 - 34 и 38 кДа, специфически связывающие GMDP. Белки с массами 32 - 34 кДа обнаруживались также методом Вестерн-блот-анализа с использованием биотинилированного конъюгата полиакриламида с иммобилизованным на нем GMDP-Lys ((GMDP-Lys)-PAA-(Bi)) в клеточном лизате перитонеальных макрофагов мыши.

*Ключевые слова:* рецепторы мурамоилпептидов, фотоаффинное мечение, радиолигандный анализ.

N-Ацетилглюкозаминил - (β1-4)-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамин (GMDP) - фрагмент бактериальной клеточной стенки, обладающий множеством биологических активностей. В частности, GMDP проявляет адьювантное и противоопухолевое действие, индуцирует неспецифическую устойчивость к вирусным и бактериальным инфекциям [1, 2]. Механизм действия GMDP, как и других мурамоилпептидов, до настоящего времени остается малоизученным. Среди возможных молекулярных механизмов биологической активности мурамоилпептидов наиболее вероятным является рецепторный. Доводом в его пользу может служить стереоспецифичность этих соединений, а также насыщаемый характер зависимости "доза-ответ" для некоторых биологических эффектов [3 - 5]. К началу данной работы имеющиеся в литературе сведения о мурамоилпептидсвязывающих молекулах

были достаточно противоречивы как в плане самого существования рецепторов мурамоилпептидов, так и относительно их локализации и числа. По данным Силвермана и сотр. [6] мурамоилпептидсвязывающие центры локализованы на поверхности макрофагов в количестве не более 500 - 1000 на клетку. В то же время по данным других исследователей [5, 7, 8] рецепторы мурамоилпептидов находятся внутри клеток-мишеней и число их составляет десятки - сотни тысяч [5].

Мы использовали производные GMDP, меченные йодом-125, с целью изучения как поверхностных, так и внутриклеточных GMDP-связывающих центров перитонеальных макрофагов мыши. Для установления мембранной или внутриклеточной локализации центров связывания N-ацетилглюкозаминилсодержащих мурамоилпептидов использовали соответственно нативные и перфорированные клетки.

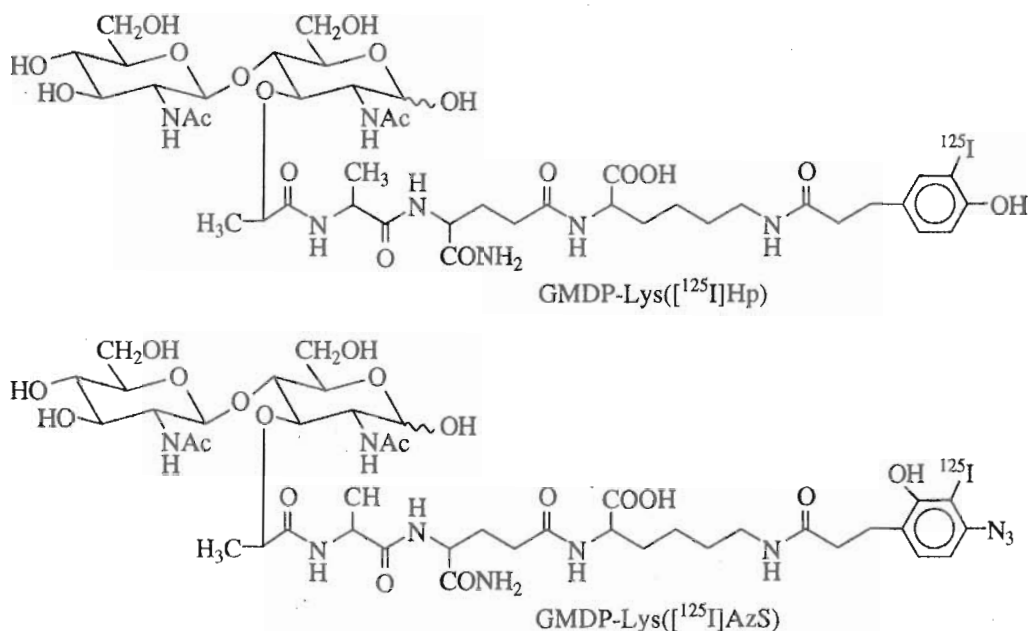
Первым этапом исследования явилось изучение связывания GMDP с поверхностью перитонеальных макрофагов мыши. Исследование взаимодействия мурамоилпептидов с клетками-мишенями осуществлялось с использованием радиолигандного метода анализа, прежде всего из-за его высокой чувствительности. В нашем распоряжении имелось йод-125-меченое производное биологически активного аналога GMDP - GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr) (200 Ки/ммоль), полученное сотрудником лаборатории рецепции нейропептидов ИБХ РАН А.А. Кайдаловым. Оно было синтезировано [9] путем радиоiodирования модифицированного реагентом Болтона-Хантера по ε-аминогруппе

Сокращения: GMDP - N-ацетилглюкозаминил-(β1-4)-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамин; GMDP-Lys - N-ацетилглюкозаминил-(β1-4)-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамилизидин; L-GMDP - N-ацетилглюкозаминил-(β1-4)-N-ацетилмурамоил-L-аланил-L-изоглутамин; MDP - N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамин; Hr - 3-(4-гидроксифенил)пропионил; Lys(AzS) - N<sup>ε</sup>-(4-азидосалицилоил)лизин; GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]AzS) - N-ацетилглюкозаминил-(β1-4)-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамил-N<sup>ε</sup>-(3-[<sup>125</sup>I]-4-азидосалицилоил)лизин; BSA - бычий сывороточный альбумин; PBS - фосфатно-солевой буферный раствор, pH 7.4; MOPS - 3-[N-морфолино]пропансульфоная кислота; PMSF - фенилметилсульфонилфторид; FCS - эмбриональная телячья сыворотка.

\* Автор для переписки.

GMDP-Lys [10]. Для снижения уровня эндоцитоза анализ связывания нативных клеток с лигандами вели при 4°C в присутствии 0.01% азида натрия. За величину специфического связывания прини-

мали разность между значениями общего связывания и неспецифического связывания, измеряемого в присутствии 1000-кратного избытка немеченого GMDP.



Изучение кинетики связывания GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr) с перитонеальными макрофагами мыши показало, что общее связывание GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr) с нативными макрофагами возрастало с увеличением времени инкубации, в то время как специфическое практически не изменялось уже через 5 мин после начала эксперимента (рис. 1).

Специфичность связывания GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr) с макрофагами подтверждалась данными ингибиторного анализа. Из рис. 2 видно, что способность конкурировать с GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr) за участки связывания в наибольшей степени была присуща GMDP и GMDP-Lys. Ингибирующая активность стереоизомера GMDP с *L*-конфигурацией остатка изоглутамина (*L*-GMDP) была значительно ниже, что свидетельствует о важности конфигурации этого остатка. Таким образом, наблюдалась корреляция между специфичностью GMDP-связывающих поверхностных молекул и стереоспецифичностью биологической активности глюкозаминилмурамоилпептидов, поскольку *L*-GMDP биологической активностью не обладает [2].

Построение графика связывания в координатах Скэтчарда позволило определить константу диссоциации лиганд-рецепторного комплекса и количество участков связывания на клетку (рис. 3). Для нативных макрофагов константа диссоциации составила 350 пМ, а число центров связывания — в пределах 500 - 1000 на одну клетку. Полученные результаты согласуются с литературными данными о наличии на плазматической мембране не-

большого числа участков связывания мурамоилпептидов, причем значения константы диссоциации и максимального связывания практически не отличаются от таковых, полученных в работе Силвермана для мурамоилдипептида [6].

При проведении экспериментов с помощью радиорецепторного анализа был отмечен высокий уровень неспецифической сорбции, что при наличии разброса величин между параллельными пробами обусловило необходимость многократного

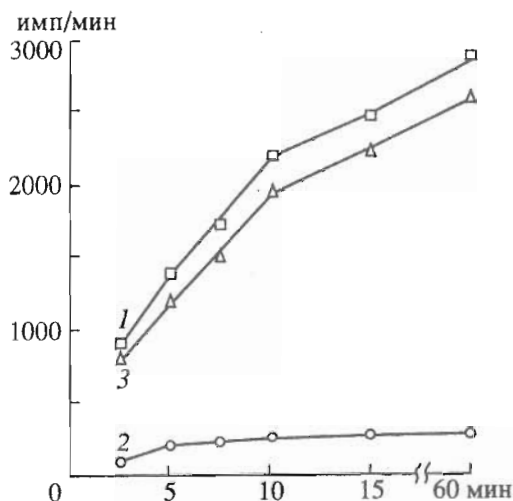


Рис. 1. Зависимость общего (1), специфического (2) и неспецифического (3) связывания GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr) с нативными перитонеальными макрофагами мыши от времени инкубации.



Рис. 2. Ингибирование связывания GMDP-Lys( $^{125}\text{I}$ Hr) с нативными макрофагами GMDP (2) и его аналогами GMDP-Lys (1) и L-GMDP (3).

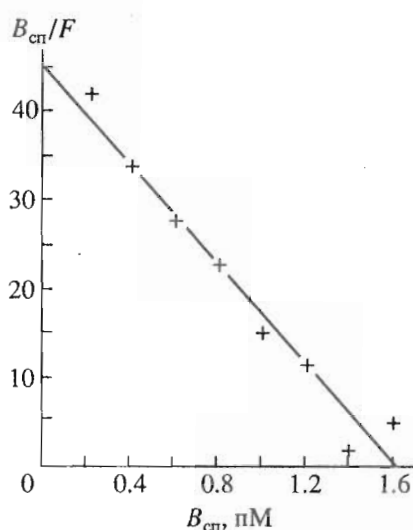


Рис. 3. График связывания GMDP-Lys( $^{125}\text{I}$ Hr) с нативными макрофагами в координатах Скэтчарда ( $B_{\text{сп}}$  — доля специфически связанного лиганда,  $F$  — доля свободного лиганда).

повторения экспериментов для получения статистически достоверных результатов.

Функциональное значение мембранных сайтов связывания мурамоилпептидов остается недостаточно изученным. Получено множество данных, демонстрирующих тот факт, что для проявления биологической активности мурамоилпептиды должны проникнуть внутрь клетки. Об этом свидетельствует усиление макрофагактивирующей способности мурамоилпептидов в случае: 1) их инкапсулирования внутрь липосом [7, 11]; 2) конъюгации с бычьим сывороточным альбумином, несущим остатки маннозы (наличие у макрофагов маннозоспецифического рецептора позволяет им более эффективно поглощать конъюгированный GMDP по сравнению со свободным) [12]; 3) конъюгации с антимacroфагальными моноклональными антителами [13]. Внутриклеточные GMDP-связывающие центры найдены у клеток

миеломоноцитарного ряда, Т-хелперов, клеток нейробластомы [5]. У перитонеальных макрофагов мыши нами было обнаружено 100000 специфических сайтов связывания мурамоилпептидов, причем было показано, что существует по крайней мере два их типа: с константами диссоциации 20 и 540 нМ [5].

С целью предварительной характеристики внутриклеточных GMDP-связывающих молекул макрофагов был использован метод фотоаффинного мечения, позволяющий ковалентно присоединить радиоактивно меченный лиганд к рецептору и в дальнейшем идентифицировать рецепторные белки по наличию радиоактивной метки. Для ковалентного связывания GMDP с рецептором было синтезировано радиоактивно меченное производное GMDP-Lys( $^{125}\text{I}$ AzS), описанное В.И. Цетлиным с соавт. [19].

Для синтеза фотоактивируемого производного GMDP использовали N-оксисукцинимидный эфир 4-азидосалициловой кислоты. Очистку конъюгата GMDP-Lys(AzS) производили методом ВЭЖХ на обращенной фазе. GMDP-Lys(AzS) элюировался двумя пиками, соответствовавшими двум аномерам дисахаридного остатка GMDP (рис. 4). В результате быстрой интерконверсии аномеров, свойственной GMDP и его производным [14], при рехроматографии каждого аномера профиль элюции имел двухпиковый характер, аналогичный исходному. Поэтому фракции, соответствующие двум пикам, объединяли и использовали для дальнейшей модификации. На следующей стадии в молекулу GMDP-Lys(AzS) вводили радиоактивный  $^{125}\text{I}$  с использованием хлорамина Т по стандартной методике [9]. Очистку конъюгата также производили методом ВЭЖХ на обращенной фазе (рис. 5).

GMDP-Lys( $^{125}\text{I}$ AzS) связывался с макрофагами, перфорированными 0.001% дигитонином, причем наблюдалось как специфическое, так и неспецифическое связывание, так как даже при вытеснении немеченым GMDP уровень связывания фотоактивируемого йодпроизводного с клетками оставался очень высоким (до 60%). По всей вероятности, неспецифическое связывание происходит за счет йодазидосалицилоильной группировки. Тем не менее способность фотоактивируемого производного GMDP конкурировать за места связывания с исходной молекулой GMDP позволяла использовать его в опытах по ковалентному мечению GMDP-связывающих центров.

После инкубации перфорированных дигитонином перитонеальных макрофагов с GMDP-Lys( $^{125}\text{I}$ AzS) в отсутствие или в присутствии избытка немеченого GMDP клетки облучали УФ-светом, после чего лизировали горячим буфером для приготовления электрофоретических образцов и анализировали методом электрофореза

в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия с последующей радиоавтографией. В результате было показано наличие ряда меченых белков, однако лишь часть из них связывала радиоактивный лиганд специфически, за счет мурамоилпептидной группировки. Связывание GMDP-Lys( $^{125}\text{I}$ AzS) с белками молекулярной массы 32 - 34 и 38 кДа полностью подавлялось при добавлении 1000-кратного избытка немеченого GMDP (рис. 6). В то же время связывание с белком *M* 43 кДа при добавлении 1000- и 10000-кратного избытка немеченого GMDP ингибировалось лишь частично. Связывание белка *M* 43 кДа  $^{125}\text{I}$ -меченым аналогом полностью ингибировалось 100-кратным избытком конъюгата GMDP-Lys(AzS). По-видимому, в связывании с этим белком участвует вся молекула GMDP-Lys(AzS). В противовес полученным нами данным Тену и сотр. [8] было показано, что связывание MDP-Lys( $^{125}\text{I}$ AzS) с внутренним рецептором альвеолярных макрофагов кролика, имеющим молекулярную массу 40 - 45 кДа, может быть полностью подавлено избытком немеченого MDP. В настоящее время остается неясным, осуществляют ли мурамоилпептидсвязывающие молекулы кролика (40 - 45 кДа) и мыши (43 кДа) аналогичные функции или нет.

Таким образом, наиболее вероятными внутриклеточными мишенями GMDP являются полипептиды с молекулярными весами 32 - 34 и 38 кДа.

Данные фотоаффинного мечения были подтверждены с использованием биотинилированного конъюгата (GMDP-Lys)-PAA-(Bi). Последний представляет собой растворимый конъюгат полиакриламида с иммобилизованными на нем GMDP-Lys (20 мольн. %), присоединенным к полимеру через  $\epsilon$ -аминогруппу лизина, и биотином (5 мольн. %). Молекулярная масса полимера составляла 40 кДа. Клеточный лизат перитонеальных макрофагов мыши был подвергнут электрофорезу в системе Леммли с последующим Вестерн-блоттингом. Инкубация нитроцеллюлозной мембраны с (GMDP-Lys)-PAA-(Bi), а затем со стрептавидин-пероксидазой выявила слабоокрашенные белковые полосы с молекулярными массами 32 и 34 кДа, связывание с которыми (GMDP-Lys)-PAA-(Bi) полностью отменялось избытком GMDP (рис. 7). (GMDP-Lys)-PAA-(Bi) не связывался с полипептидом с молекулярным весом 38 кДа, что, по-видимому, объяснялось необратимой денатурацией активного центра белка в ходе электрофореза с додецилсульфатом натрия. С другой стороны, была обнаружена интенсивная полоса, соответствующая полипептиду с молекулярной массой 18 кДа, взаимодействие с которой (GMDP-Lys)-PAA-(Bi) частично ингибировалось избытком GMDP. Белок с массой 18 кДа не был идентифицирован в процессе фотоаффинного мечения GMDP-связывающих центров внутри перфорированных перитонеальных макрофагов.

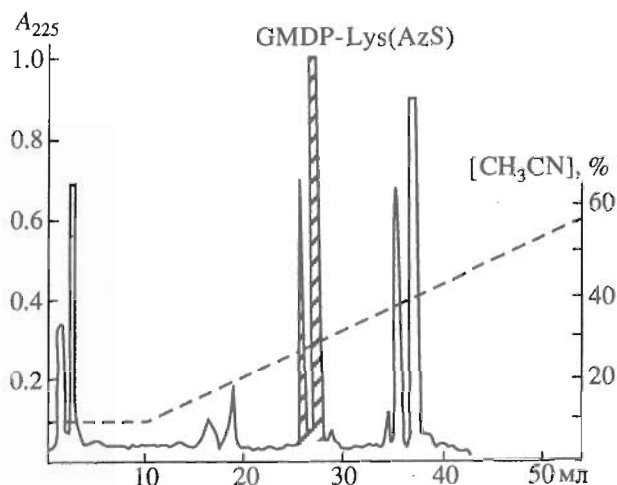


Рис. 4. Разделение продуктов конъюгации GMDP-Lys и N-оксисукцинимидного эфира 4-азидосалициловой кислоты методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке 7C<sub>8</sub>-Nucleosil (4 мм × 12 см). Изократическая элюция водным раствором 10% ацетонитрила с 0.05% трифторуксусной кислоты в течение 10 мин с последующей элюцией линейным градиентом ацетонитрила (10 - 60%) с 0.05% трифторуксусной кислоты. Скорость элюции 1 мл/мин.

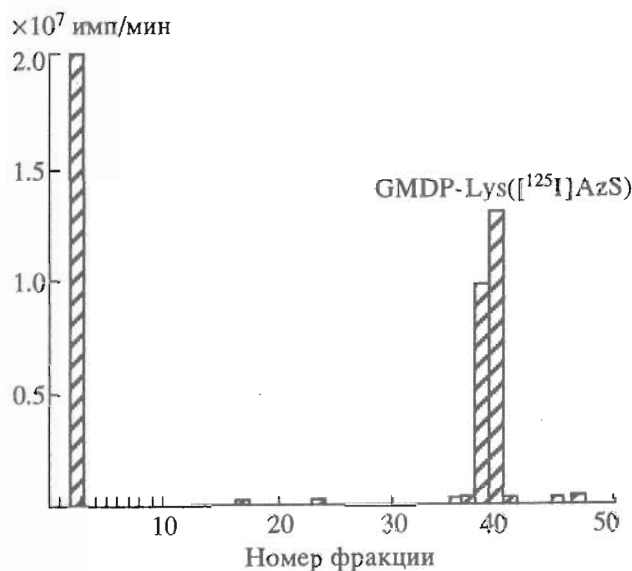


Рис. 5. Схема элюции продуктов  $^{125}\text{I}$ йодирования GMDP-Lys(AzS) с колонки 7C<sub>8</sub>-Nucleosil. Условия как на рис. 4; объем фракций 1 мл.

Возможно, он появляется в результате протеолиза более крупных молекул в процессе получения клеточного лизата, поскольку, хотя в буферный раствор и добавляли ингибитор сериновых протеиназ, другие классы протеиназ не были инактивированы. Определение N-концевой последовательности вышеупомянутых белков позволит внести ясность в этот вопрос.

Необходимо отметить, что метод фотоаффинного мечения оказался непригодным для

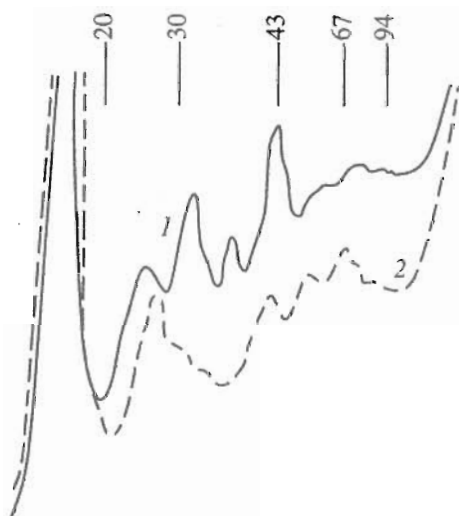


Рис. 6. Профиль сканирования радиавтографа электрофореза белков перитонеальных макрофагов мыши, перфорированных дигитонином. Фотоаффинное мечение макрофагов 3 нмоль GMDP-Lys( $^{125}\text{I}$ AzS) в отсутствие GMDP (1) и в присутствии 3 мкмоль GMDP (2). Цифры – молекулярные массы белков-маркеров (кДа).

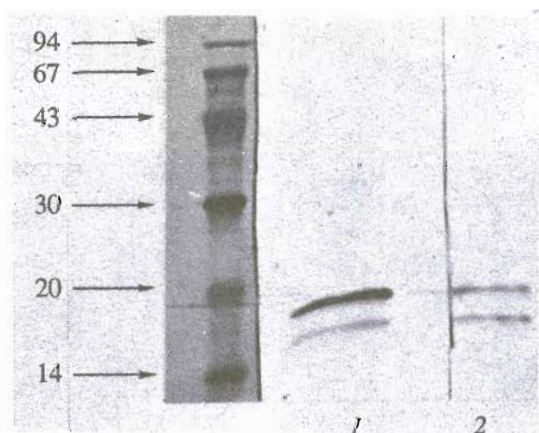


Рис. 7. Вестерн-блот-анализ белков перитонеальных макрофагов мыши: инкубация с 1 мкг/мл (GMDP-Lys)-PAA-(Bi) в отсутствие GMDP (1) и в присутствии 5 мкг/мл GMDP (2). Цифры слева – молекулярные массы белков-маркеров (кДа).

характеристики поверхностных мурамоилпептидсвязывающих центров, по-видимому, из-за малого количества этих центров и низкой эффективности фотоаффинного связывания.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались мыши BALB/C, самки (опытно-племенной питомник лабораторных животных при НИЛ биомоделей РАМН, ст. Столбовая Московской области). Использовали буферные растворы: PBS Дульбекко (Gibco); буфер

для электрофоретических образцов (0.125 M трис-HCl, pH 6.8; 4% додецилсульфата Na, 20% глицерина, 10% 2-меркаптоэтанола), PBS-BSA: 0.01 M фосфатный буфер, pH 7.4, содержащий 0.15 M NaCl и 1% BSA (Serva). GMDP, GMDP-Lys, L-GMDP были синтезированы как описано в работе [2] в лаборатории химии пептидов ИБХ РАН.  $^{125}\text{I}$ -меченое производное GMDP-Lys( $^{125}\text{I}$ Hz) [9] (2000 Ки/ммоль) было любезно предоставлено А.А. Кайдаловым (ИБХ РАН), биотинилированный псевдополисахаридный конъюгат (GMDP-Lys)-PAA-(Bi), полученный по методу [15], был синтезирован Н.В. Бовиным (ИБХ РАН), конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена был любезно предоставлен В.А. Коваленко (ИБХ РАН).

**4-Азидосалициловая кислота** (все операции после добавления  $\text{NaN}_3$  проводили в темноте). Натриевую соль аминосалициловой кислоты (Chemapol) (15 г) растворяли в 5 мл концентрированной серной кислоты, добавляя постепенно соль к кислоте, и полученный раствор медленно приливали к 15 мл ледяной воды. К полученной густой суспензии добавляли раствор 0.65 г  $\text{NaNO}_2$  в 6.25 мл воды порциями в течение 20 мин. Для разложения избытка  $\text{HNO}_2$  вносили 10 мг мочевины, раствор переносили в 200-мл стакан и медленно добавляли при охлаждении раствор 1 г  $\text{NaN}_3$  в 5 мл воды. После прекращения выделения азота суспензию перемешивали 2 ч при охлаждении. Осадок отфильтровывали и промывали ледяной водой, после чего высушивали на фильтре.

**N-Окисукцинимидный эфир 4-азидосалициловой кислоты** [16]. К раствору 4-азидосалициловой кислоты (0.36 г) в 5 мл 1,4-диоксана добавляли сначала 0.25 г N-гидроксисукцинимид в 5 мл 1,4-диоксана, а затем раствор 0.42 г дициклогексилкарбодиимид в 5 мл диоксана. Реакционную смесь выдерживали в течение ночи при  $4^\circ\text{C}$ , мочевину осаждали центрифугированием и супернатант упаривали. Все операции проводили в темноте.

**GMDP-(N<sup>ε</sup>-4-азидосалицилоил)лизин** [9]. К раствору 800 мкг GMDP-лизина в 200 мкл 0.05 M фосфатного буфера, pH 7.5, добавляли 250 мкг N-оксисукцинимидного эфира 4-азидосалициловой кислоты в 25 мкл 1,4-диоксана. Реакцию проводили 30 мин в темноте при перемешивании при комнатной температуре. Конъюгат очищали на колонке Nucleosil 7C<sub>8</sub> (Macherey-Nagel). Колонку уравнивали 10% водным ацетонитрилом, содержащим 0.05% трифторуксусной кислоты. Разделение проводили в градиенте 10 - 60% ацетонитрила с 0.05% трифторуксусной кислоты. Конъюгат элюировался при 25 - 28% ацетонитрила. Собранные фракции лиофилизировали. Анализ чистоты конъюгата проводили с помощью тонкослойной хроматографии в системе метанол-этилацетат (1 : 10)

на пластинах Eastman фирмы Kodak, проявляемых под УФ-лампой.

**Радиоiodирование GMDP-(N<sup>ε</sup>-4-азидосалицилоил)лизина [9].** В ампулу с 75 мкг NaI, содержащую 0.09% <sup>125</sup>I (49 МБк), вносили 50 мкг конъюгата в 50 мкл 0.05 М фосфатного буфера, pH 7.5. В полученный раствор добавляли 10 мкл 1% раствора хлорамина Т в деионизованной воде. Через 30 с реакцию останавливали добавлением 10 мкл 1% раствора тиосульфата натрия в деионизованной воде.

**Очистка GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]AzS) методом ВЭЖХ** проводилась на колонке Nucleosil 7C<sub>8</sub> (Macherey Nagel). Колонку уравнивали 10% водным ацетонитрилом, содержащим 0.05% трифторуксусной кислоты. Разделение проводили в градиенте 10 - 60% ацетонитрила с 0.05% трифторуксусной кислоты. Из фракций объемом 1 мл отбирали аликвоты (10 мкл) и измеряли их радиоактивность на гамма-счетчике Compugamma (LKB). Удельная активность полученного продукта составляла  $3 \times 10^3$  имп/мин на 1 пмоль конъюгата.

**Выделение перитонеальных макрофагов.** Мышей забивали методом цервикальной дислокации и отбирали перитонеальную жидкость [4]. Клетки инкубировали 1 ч в PBS Dulbecco (Gibco), содержащем 5% FCS, в пластиковых чашках Петри в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Монослой трижды отмывали PBS Dulbecco, после чего макрофаги снимали скребком.

**Фотоаффинное мечение GMDP-связывающих молекул.** 10<sup>6</sup> макрофагов перфорировали инкубацией с 0.001% раствором дигитонина в PBS Dulbecco в течение 1 мин при 20°C, после чего трижды отмывали пятикратным объемом PBS Dulbecco и ресуспендировали в 1 мл того же буфера. Образцы обрабатывали 30 мин в пластиковых чашках Петри диаметром 32 мм аликвотой конъюгата (10<sup>7</sup> имп/мин, 3.3 нмоль) при 37°C в темноте. Затем образцы инкубировали 5 мин при 4°C в темноте и освещали 10 мин с расстояния 15 см лампой Black Ray CL-215 (UV Products INC) в пластиковых чашках Петри диаметром 32 мм. Для ингибирования специфического связывания наряду с GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]AzS) добавляли немеченый GMDP в соотношении 1000 : 1 или 10000 : 1 или немеченый конъюгат GMDP-Lys(AzS) в соотношении 100 : 1.

**Электрофорез в системе Лэммли [17].** Клетки собирали и осаждали центрифугированием при 400g в течение 10 мин при 4°C. Осажденные клетки лизировали горячим буфером для приготовления электрофоретических образцов и кипятили 5 мин. Электрофорез проводили в 12% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия [17]. Молекулярные массы определяли в сравнении с маркерными белками (Pharmacia). После окрашивания кумасси R-250, обесцвечивания и высушивания

гели подвергались радиоавтографии (5 - 15 сут при -70°C) с использованием рентгеновской пленки РТ-6М (СССР) и усиливающего экрана.

**Анализ кинетики связывания GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr) с нативными макрофагами.** К 100 мкл клеточной суспензии в PBS-BSA ( $5 \times 10^6$  клеток/мл) добавляли GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr) ( $2 \times 10^6$  имп/мин, 0.45 нмоль) в 10 мкл PBS, после чего инкубировали при 4°C в течение различных интервалов времени (от 0 до 2 ч). Через равные промежутки времени (2.5 мин) отбирали пробы и пропускали через фильтры GF/F (Whatman), предварительно выдержанные 12 ч при 4°C в 25 mM MOPS-КОН-буфере с 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.4 (буфер А), содержащем 1% BSA для уменьшения уровня неспецифического связывания. Каждый фильтр после осаждения клеток промывали три раза 3 мл буфера А с 1% BSA и определяли уровень радиоактивности фильтров. Для оценки величины неспецифической сорбции в контрольные пробы наряду с GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr) добавляли 140 нмоль холодного GMDP. Величину специфической сорбции определяли как разность между общей и неспецифической сорбцией. При этом величину среднего отклонения оценивали как отношение среднеквадратичного отклонения к среднему значению величины специфической сорбции.

**Ингибиторный анализ связывания GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr) с макрофагами.** К 100 мкл суспензии интактных клеток в PBS-BSA с 0.01% азидом натрия ( $5 \times 10^6$  клеток/мл) добавляли 10 мкл ( $2 \times 10^6$  имп/мин, 0.45 нмоль) GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr). В контрольные пробы вносили 0.01 - 10 мкмоль ингибитора (GMDP, GMDP-Lys или L-GMDP). Инкубировали 30 мин при 4°C. Затем клеточную суспензию пропускали через фильтр GF/F (Whatman) и трижды промывали буфером А с 0.1% BSA. Уровень радиоактивности фильтров определяли на гамма-счетчике.

**Анализ зависимости связывания GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr) с макрофагами от концентрации лиганда.** К 100 мкл ( $5 \times 10^6$  клеток/мл) суспензии интактных клеток в PBS-BSA с 0.01% азидом натрия добавляли возрастающие количества GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr) (от 67.5 пмоль до 2.25 нмоль). В контрольные пробы вносили, кроме того, 1000-кратный избыток GMDP. Инкубировали 30 мин при 4°C. Затем клеточную суспензию пропускали через фильтр GF/F (Whatman), трижды промывали буфером А с 0.1% BSA и определяли уровень радиоактивности фильтров.

**Вестерн-блот-анализ белков клеточного лизата перитонеальных макрофагов мыши.**  $5 \times 10^7$  клеток лизировали осмотическим шоком в буферном растворе Б (2 mM трис-HCl, pH 7.6; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM PMSF) и убирали ядра и неразрушенные клетки центрифугированием при 2000g. Белок, осажденный из супернатанта 5-кратным

объемом ацетона, после выдерживания при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение ночи растворяли в буфере для электрофоретических образцов и кипятили 2 мин. После электрофореза с додецилсульфатом натрия в 12% ПААГ белки электрофоретически переносили на нитроцеллюлозную мембрану [18]. Мембрану инкубировали с биотинилированным (GMDP-Lys)-PAA-(Bi) (1 мкг/мл), полученным так же, как описано в работе [15]. В контрольный образец для ингибирования специфического связывания добавляли GMDP до концентрации 5 мкг/мл. Связавшийся конъюгат визуализировали конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена в разведении 1 : 5000 с последующим проявлением 4-хлор-1-нафтолом.

Авторы выражают благодарность А.А. Кайдалову за предоставление GMDP-Lys( $^{125}\text{I}$ )Hr), Н.В. Бовину и А.Е. Землякову за синтез биотинилированного (GMDP-Lys)-PAA-(Bi), В.А. Коваленко за предоставление конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена, В.И. Туробову за помощь в выполнении радиоавтографии, а также Ю.Н. Уткину за ценные советы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванов В.Т. // *Вопр. мед. химии*. 1984. Т. 30. № 3. С. 23 - 31.
2. Ростовцева Л.И., Андропова Т.М., Малькова В.П., Сорокина И.Б., Иванов В.Т. // *Биоорган. химия*. 1981. Т. 7. № 12. С. 1843 - 1858.
3. Lederer E. // *Clin. Immun. Newslet*. 1982. V. 3. P. 83 - 86.
4. Nesmeyanov V.A., Khaidukov S.V., Komaleva R.L., Andronova T.M., Ivanov V.T. // *Biomed. Sci*. 1990. V. 1. № 2. P. 151 - 153.
5. Sumaroka M.V., Litvinov I.S., Khaidukov S.V., Golovina T.N., Kamraz M.V., Komaleva R.L., Andronova T.M., Makarov E.A., Nesmeyanov V.A., Ivanov V.T. // *FEBS Lett*. 1991. V. 295. № 1 - 3. P. 48 - 50.
6. Silverman D.H., Krueger J.M., Karnovsky M.L. // *J. Immunol*. 1986. V. 136. № 6. P. 2195 - 2201.
7. Fogler W.E., Fidler I.J. // *J. Immunol*. 1986. V. 136. № 6. P. 2311 - 2317.
8. Tenu J.-P., Adam A., Souvannavong V., Yapo A., Petit J.-F., Douglas K. // *Int. J. Immunopharmacol*. 1989. V. 11. № 6. P. 653 - 661.
9. Kaydalov A.A., Utkin Yu.N., Andronova T.M., Tsetlin V.I., Ivanov V.T. // *FEBS Lett*. 1989. V. 248. № 1, 2. P. 78 - 82.
10. Bolton A.E., Hunter W.M. // *Biochem. J*. 1973. V. 133. № 1. P. 529 - 539.
11. Fogler W.E., Fidler I.J. // *Int. J. Immunopharmacol*. 1987. V. 9. № 2. P. 141 - 159.
12. Roche A.C., Midoux P., Pimpaneau V., Negre E., Mayer R., Monsigny M. // *Res. Virol*. 1990. V. 141. № 1. P. 243 - 249.
13. Midoux P., Martin A., Collet B., Monsigny M., Roche A.-C., Toujas L. // *Bioconjug. Chem*. 1992. V. 3. № 2. P. 194 - 199.
14. Кайдалов А.А., Уткин Ю.Н., Андропова Т.М., Цетлин В.И., Иванов В.Т. // *Биоорган. химия*. 1987. Т. 13. № 5. С. 1523 - 1529.
15. Bovin N.V., Korchagina E.Yu., Zemlyanukhina T.V., Byratova N.E., Galanina O.E., Zemlyakov A.E., Ivanov A.E., Zubov V.P., Mochalova L.V. // *Glycoconjug. J*. 1993. V. 10. P. 142 - 151.
16. Dupuis G. // *Can. J. Chem*. 1987. V. 65. № 10. P. 2450 - 2453.
17. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680 - 685.
18. Burnett W.N. // *Anal. Biochem*. 1981. V. 112. № 1. P. 195.
19. Tsetlin V.I., Utkin Yu.N., Lazakovich E.M., Kaydalov A.A. // *Second Forum on Peptides. Colloque INSERM / Eds Aubry A., Marraud M., Vitoux B. John Libbey Eerotext Ltd.*, 1989. V. 174. P. 171 - 174.

## Polypeptides from Murine Peritoneal Macrophages that Bind Glucosaminylmuramyl dipeptides

T. N. Golovina, M. V. Sumaroka, L. V. Samokhvalova, Yu. V. Shebzukhov, E. A. Makarov, and V. A. Nesmeyanov\*

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

**Abstract** - By means of radioligand analysis, murine peritoneal macrophages were shown to express several hundreds cell surface high-affinity GMDP-binding sites with a binding constant 350 pM. Photoaffinity labeling followed by SDS-PAGE enabled us to identify inside these cells 32 - 34 and 38 kDa proteins, specifically binding GMDP. Proteins 32 - 34 kDa were also detected by Western blotting analysis using biotinylated conjugate of polyacrylamide with immobilized GMDP-Lys [(GMDP-Lys)-PAA-(Bi)] in cell lysate of murine peritoneal macrophages.

**Key words:** muramyl peptide receptors, photoaffinity labeling, radioligand analysis.

\* To whom correspondence should be addressed.