



УДК 577.112.384.4.017

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ *L*-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА РЕЦЕПЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ HL-60

© 1998 г. И. А. Костанян[#], Р. И. Нуриева*, Е. В. Наволоцкая**, М. В. Астапова, С. М. Драницына, В. П. Завьялов**, В. М. Липкин

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

*Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пушкино Московской области;

**Институт инженерной иммунологии, пос. Любучаны Московской области

Поступила в редакцию 12.05.97 г. Принята к печати 08.09.97 г.

Обнаружено, что *L*-глутаминовая кислота в концентрации 0.1 мкМ вызывает дифференцировку клеточной линии промиелоцитарного лейкоза HL-60 по гранулоцит/нейтрофильному пути. Клетки HL-60 не имеют специфических глутаматсвязывающих участков, однако *L*-глутаминовая кислота влияет на рецепцию клетками некоторых цитокинов. Так, в концентрации 0.1 мкМ *L*-глутаминовая кислота полностью ингибирует высокоаффинное связывание клетками HL-60 ¹²⁵I-меченого человеческого рекомбинантного интерлейкина-1β (rHuIL-1β) (K_d 0.32 нМ), не влияя на низкоаффинное связывание (K_d 13.3 нМ) и не изменяя общего числа IL-1β-связывающих участков. Предынкубация клеток HL-60 с 0.1 мкМ *L*-глутаминовой кислотой увеличивает число рецепторов ¹²⁵I-меченого человеческого рекомбинантного фактора некроза опухоли β (rHuTNF-β) в 2.5 раза. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли *L*-глутаминовой кислоты в дифференцировке клеток крови миелоидного ряда.

Ключевые слова: *L*-глутаминовая кислота, интерлейкин-1, фактор некроза опухоли, рецепторы, дифференцировка.

Поиск новых эндогенных факторов, подавляющих неограниченную пролиферацию опухолевых клеток и вызывающих их дифференцировку, – одна из важнейших задач современной биоорганической химии. Клеточная линия промиелоцитарного лейкоза HL-60 является удобной моделью для изучения процессов клеточной дифференцировки. В зависимости от используемого индуктора эти клетки могут дифференцироваться в различные типы клеток миелоидного ряда, теряя при этом способность к неограниченному росту. Такие агенты, как диметилсульфоксид [1, 2] и ретиноевая кислота [3–5], вызывают дифференцировку клеток линии HL-60 по гранулоцит/нейтрофильному пути, а витамин D₃ [6, 7] и форболовые эфиры [8, 9] – в моноцит/макрофагоподобные клетки.

В ходе дифференцировки клеток HL-60 под действием различных индукторов в среде культивирования наряду с известными цитокинами, та-

кими, как фактор некроза опухоли (TNF-α) и интерлейкины (IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-12) [11–13], накапливаются не изученные до сих пор пептидно-белковые факторы, способные вызывать дифференцировку исходной клеточной линии HL-60 как по гранулоцитарному [14, 15], так и по моноцит/макрофагальному [16, 17] путям.

Ранее нами из культуральной среды клеток HL-60, обработанных ретиноевой кислотой, были выделены и охарактеризованы два фактора, индуцирующие дифференцировку клеток этой линии в гранулоцитоподобные клетки: полипептид с молекулярной массой 8.2 кДа и низкомолекулярное соединение, идентифицированное на основании данных аминокислотного и масс-спектрометрического анализа как *L*-глутаминовая кислота [14, 15].

На рис. 1 показана зависимость степени дифференцировки клеток HL-60 от концентрации *L*-глутаминовой кислоты. Интересно, что проявляется дифференцирующая активность только при добавлении водного раствора *L*-глутаминовой кислоты. При растворении *L*-глутаминовой кислоты в среде RPMI 1640, содержащей фетальную сыворотку теленка, ее дифференцирующая активность теряется.

Сокращения: rHuIL-1β и rHuIL-2 – рекомбинантные человеческие интерлейкины 1β и 2; IL-1 и IL-2 – интерлейкины 1 и 2; rHuTNF-β – рекомбинантный человеческий фактор некроза опухоли β; TNF – фактор некроза опухоли.

[#]Автор для переписки (тел.: (095)336-55-11; факс: (095)310-70-10; e-mail: Lipkin@ibch.siobc.ras.ru).

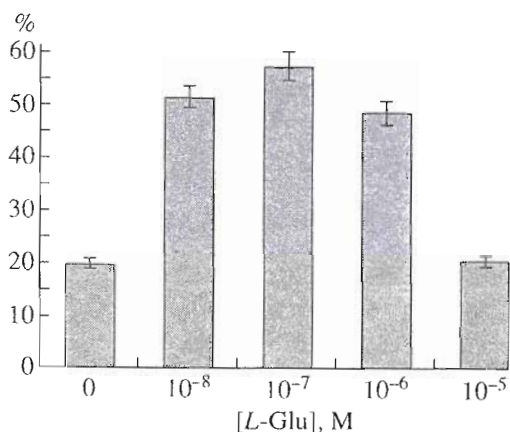


Рис. 1. Зависимость степени дифференцировки клеток HL-60 от концентрации *L*-глутаминовой кислоты. По оси ординат: количество NTB-положительных клеток (в процентах).

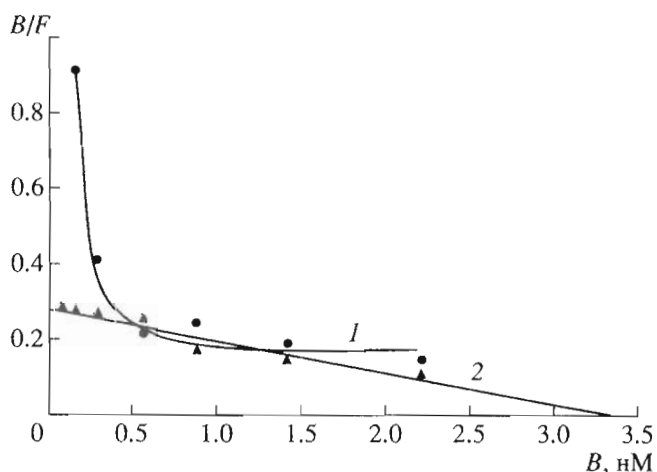


Рис. 2. Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания [¹²⁵I]гHuIL-1β с клетками HL-60 в нормальных условиях (1) и в присутствии 0.1 мкМ *L*-глутаминовой кислоты (2). Здесь и на других рисунках *B* и *F* – молярные концентрации специфически связанного и свободного цитокина.

В настоящей работе изучено действие *L*-глутаминовой кислоты на рецепцию клетками HL-60 цитокинов, вовлеченных в процесс дифференцировки этих клеток по гранулоцитарному пути.

Недавно нами были обнаружены и охарактеризованы специфические рецепторы *L*-глутаминовой кислоты на поверхности Т-лимфоцитов из крови здоровых доноров [18]. Показано, что глутаматсвязывающие участки локализованы на внешней стороне плазматической мембраны Т-лимфоцитов и имеют белковую природу. С помощью *L*-[³H]Glu определена константа диссоциации (K_d) комплекса *L*-Glu–рецептор (K_d 2.36×10^{-7} М). Используя набор немеченых аминокислот и синтетических пептидов, мы показали высокую специфичность

связывания. Выявленные рецепторы чувствительны к агонисту глутаматных рецепторов центральной нервной системы – квискалиновой кислоте.

Попытка идентифицировать рецепторы *L*-глутаминовой кислоты в клетках линии HL-60 оказалась безуспешной. Многократно проведенные эксперименты по связыванию *L*-[³H]Glu с клетками и выделенными из них субклеточными фракциями (мембраны, ядра) в различных условиях (варьировались состав реакционного буфера, время проведения реакции, температурный режим) показали, что специфические глутаматсвязывающие участки в клетках HL-60 отсутствуют, при этом уровень неспецифического связывания *L*-[³H]Glu был очень низким (<0.08%).

Поскольку рецепторы *L*-глутаминовой кислоты у клеток HL-60 не были обнаружены, логично было предположить, что вызывающее дифференцировку действие этого соединения проявляется опосредованно через влияние на рецепцию каких-то других цитокинов или факторов.

Многочисленные исследования последних лет показывают, что вне зависимости от типа используемого индуктора посредниками подавления роста и индукции дифференцировки клеток лейкозных линий М-1, ТНР-1, U-937 и HL-60 являются в основном TNF и IL-1. В ряде случаев наблюдается синергизм действия цитокинов. Так, например, гHuTNF индуцирует дифференцировку мышинной клеточной линии М1 миелоидного лейкоза только в присутствии IL-1 [11]. Хотя при дифференцировке клеток линии ТНР-1 монобластного лейкоза синергизм TNF и IL-1 не проявляется, а для потенцирования действия TNF присутствие IL-1 не требуется, клетки ТНР-1, обработанные TNF, секретируют IL-1 [11, 19]. Подобный эффект наблюдается и в случае TNF-стимулированных макрофагов, которые также продуцируют IL-1 [20, 21].

Показано, что такие индукторы дифференцировки, как ретиноевая кислота [4, 22], γ-интерферон (IFN-γ) [23], 1α,25-дигидроксипроизводное витамина D₃ [12, 24] и фактор дифференцировки r48 клеток линии HL-60 [13], значительно усиливают экспрессию генов IL-1β и TNF-α, но практически не влияют на экспрессию гена IL-6 (соответствующая мРНК не обнаружена) [13].

Мы изучили влияние *L*-глутаминовой кислоты на рецепцию клетками HL-60 меченных ¹²⁵I рекомбинантных человеческого фактора некроза опухоли-β (гHuTNF-β), интерлейкина-1β (гHuIL-1β) и интерлейкина-2 (гHuIL-2).

Установлено (рис. 2), что в отсутствие *L*-глутаминовой кислоты меченый гHuIL-1β связывался с участками двух типов: высокоаффинными (K_d 3.2×10^{-10} М) и низкоаффинными (K_d 1.3×10^{-8} М). Введение в среду инкубации 0.1 мкМ *L*-глутами-

новой кислоты вызывало исчезновение составляющей, отражающей высокоаффинное связывание [125 I]гHuIL-1 β , а график Скэтчарда трансформировался в прямую линию (2). При этом общее количество участков связывания меченого гHuIL-1 β не менялось, а константа связывания соответствовала константе связывания меченого цитокина с низкоаффинными участками в отсутствие *L*-глутаминовой кислоты (K_d 1.2×10^{-8} М). Следует отметить, что 12-часовая прединкубация клеток с 10^{-7} М *L*-глутаминовой кислотой не вызывала изменения числа IL-1 β -связывающих участков (данные не приведены).

Известны два типа рецепторов IL-1: рецептор типа I (IL-1R $_s$ I), связываясь с которым в присутствии так называемого вспомогательного белка (IL-1R-АсР) IL-1 α , β запускает каскад реакций, приводящих к биологическому ответу клетки-мишени, и рецептор типа II (IL-1R $_s$ II), функционально неактивный рецептор, или рецептор-"ловушка", прочно связывающий IL-1 α , β , но не способный передавать сигнал внутрь клетки [25–27].

В клетках, содержащих преимущественно IL-1R $_s$ I, выявлен один класс участков связывания для IL-1 α ($K_d \sim 10^{-10}$ М) и два класса участков связывания IL-1 β : один с аффинностью, близкой к аффинности связывания IL-1 α , и другой, доминирующий, с низкой аффинностью ($K_d \sim 10^{-9}$ М) [25]. Наоборот, клетки, содержащие IL-1R $_s$ II, имеют участки связывания IL-1 β одного класса ($K_d \sim 10^{-9}$ – 10^{-10} М) и участки связывания IL-1 α двух классов: высокоаффинные ($K_d \sim 10^{-10}$ М) и низкоаффинные ($K_d \sim 10^{-8}$ М) [25].

На основании этих данных, а также полученных нами результатов по связыванию [125 I]гHuIL-1 β с клетками HL-60 мы предположили, что эти клетки содержат рецептор IL-1R $_s$ I. Поскольку *L*-глутаминовая кислота не имеет собственных участков связывания на клетках HL-60, но в то же время ингибирует высокоаффинное связывание с ними меченого гHuIL-1 β , можно предположить, что она взаимодействует с IL-1 β в составе низкоаффинного комплекса IL-1R $_s$ I/IL-1 β , препятствуя формированию высокоаффинного комплекса IL-1R $_s$ I/IL-1 β /IL-1R $_s$ АсР.

Как видно из рис. 3, в отличие от *L*-глутаминовой кислоты ни *L*-глутамин, ни *L*-аспарагиновая кислота не оказывали существенного влияния на характер связывания [125 I]гHuIL-1 β с клетками HL-60, что свидетельствует о высокой специфичности ингибирующего действия *L*-глутаминовой кислоты.

Таким образом, показано, что *L*-глутаминовая кислота в концентрации 10^{-7} М полностью ингибирует высокоаффинное связывание [125 I]гHuIL-1 β с клетками HL-60. Отсутствие высокоаффинного связывания IL-1 β приводит к резкому снижению, а возможно, и к полному подавлению передачи

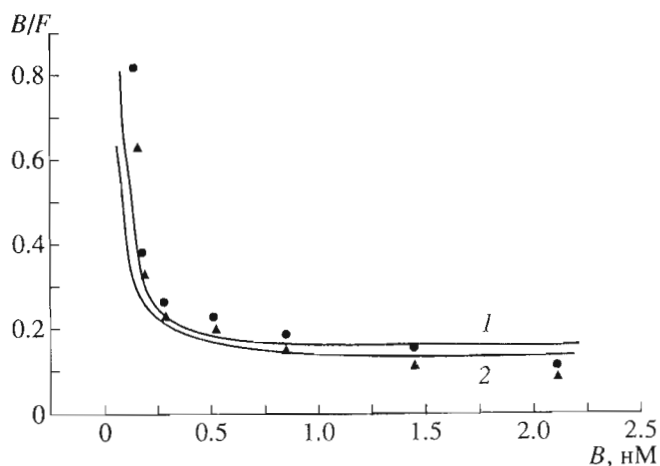


Рис. 3. Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания [125 I]гHuIL-1 β с клетками HL-60 в присутствии 0.1 мкМ *L*-глутамина (1 – K_{d1} 2.6×10^{-10} М и K_{d2} 1.2×10^{-8} М) и 0.1 мкМ *L*-аспарагиновой кислоты (2 – K_{d1} 3.6×10^{-10} М и K_{d2} 1.3×10^{-8} М).

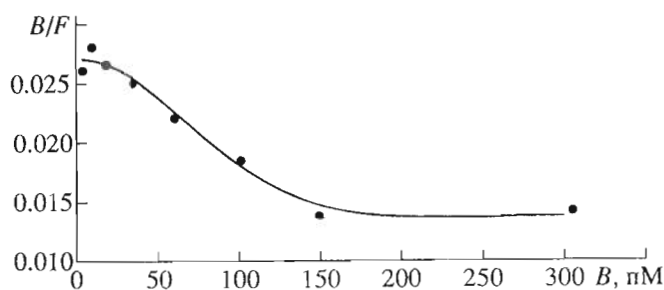


Рис. 4. Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания [125 I]гHuTNF- β с клетками HL-60 в нормальных условиях.

сигнала внутрь клетки [28]. В частности, для клеток линии HL-60 это будет означать уменьшение IL-1R $_s$ I-опосредованного пролиферативного сигнала [26, 28, 29].

Ранее авторы, изучающие дифференцировку клеток линии M1, высказали предположение, что антипролиферативное действие IL-1 на эти клетки связано с его способностью стимулировать секрецию TNF [29, 30]. В пользу этой гипотезы говорит тот факт, что как нативный IL-1, так и рекомбинантные IL-1 α , β снижают содержание рецепторов TNF в фибробластах линий FS-11 и SV-80, значительно повышая при этом устойчивость клеток к цитотоксическому действию TNF и 4 β -форбол-12-миристан-13-ацетата (PMA) [31, 32].

Мы изучили влияние гHuIL-1 β и *L*-глутаминовой кислоты на рецепцию [125 I]гHuTNF- β клетками линии HL-60. Анализ специфического связывания [125 I]гHuTNF- β интактными клетками в координатах Скэтчарда (рис. 4) выявил два класса

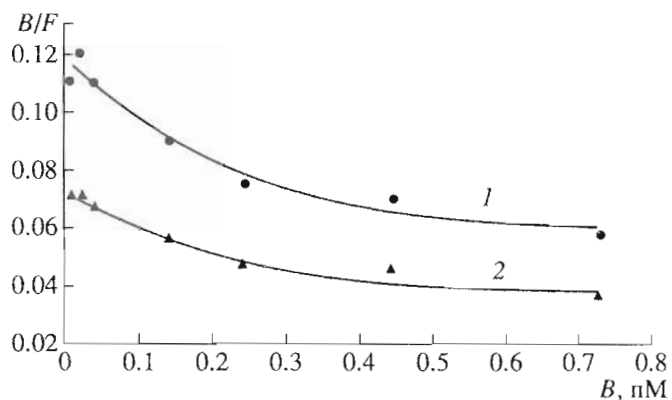


Рис. 5. Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания $[^{125}\text{I}]\text{rHuTNF-}\beta$ с клетками HL-60 в присутствии 0.1 мкМ rHuIL-1 β (1) и 0.1 мкМ L-глутаминовой кислоты (2).

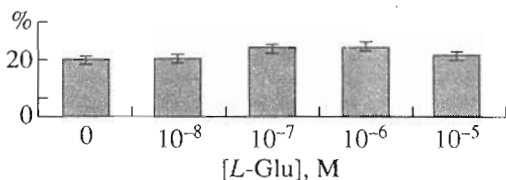


Рис. 6. Зависимость степени дифференцировки клеток K-562 от концентрации L-глутаминовой кислоты. По оси ординат: количество NTB-положительных клеток (в процентах).

участков связывания меченого цитокина: среднеаффинных (K_{d1} 8.6×10^{-9} М; n_1 1.5×10^5) и низкоаффинных (K_{d2} 6.0×10^{-8} М; n_2 6.8×10^5).

Предынкубация клеток с 10^{-7} М rHuIL-1 β в течение 12 ч приводила к увеличению числа участков связывания меченого rHuTNF- β : среднеаффинных в 2.5 раза (n_1 3.7×10^5) и низкоаффинных в 1.9 раза (n_2 12.6×10^5). Аффинность взаимодействия при этом существенно не изменялась: K_{d1} 8.6×10^{-9} М; K_{d2} 3.9×10^{-8} М (рис. 5, 1). Близкий результат получен и в случае 12-часовой предынкубации клеток HL-60 с 10^{-7} М L-глутаминовой кислотой: число средне- и низкоаффинных участков связывания возрастало соответственно в 2.5 и 2.0 раза (n_1 3.7×10^5 и n_2 13.2×10^5); средство меченого цитокина увеличивалось, хотя и незначительно: K_{d1} 5.2×10^{-9} М, K_{d2} 2.6×10^{-8} М (рис. 5, 2).

В настоящее время идентифицированы рецепторы TNF- α , β двух типов: TNF-R $_1$ и TNF-R $_2$ [33–35]. TNF-R $_1$ и TNF-R $_2$ – белки с молекулярной массой 55 и 75 кДа соответственно [36]. Величины K_d комплексов TNF-R $_1$ /TNF и TNF-R $_2$ /TNF составляют приблизительно 0.5 и 0.1 нМ [37–41]. Полагают, что основные биологические активности TNF (некроз опухоли, клеточная пролиферация и дифференцировка, апоптоз и др.) опосредованы рецептором TNF-R $_1$, хотя нельзя исключить участия

и TNF-R $_2$ в реализации некоторых из них (кроме апоптоза) [31, 41, 42].

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что клетки линии HL-60 имеют участки связывания TNF двух типов, характеризующихся относительно низкой аффинностью к $[^{125}\text{I}]\text{rHuTNF-}\beta$ и высокой плотностью. Следует отметить, что ранее на клетках HL-60 была обнаружена гомогенная популяция высокоаффинных рецепторов для меченого ^{125}I TNF- α ($K_d \sim 10^{-11}$ М) [33]. Однако позднее с помощью моноклональных антител, полученных к TNF-связывающим белкам клеток линии HL-60, были выявлены рецепторы TNF двух типов: TNF α -R $_1$ и TNF α -R $_2$ [36]. Это объясняет двухфазный ответ клеток HL-60 на индукцию TNF [43]. Полученные нами низкие значения констант связывания $[^{125}\text{I}]\text{rHuTNF-}\beta$ с рецепторами могут объясняться, во-первых, более низким средством к рецептору TNF- β по сравнению с TNF- α [39] и, во-вторых, возможным снижением активности TNF- β при иодировании.

TNF индуцирует дифференцировку в моноциты клеток ряда человеческих лейкозных линий: миелобластной ML-1, монобластной ТНР-1 и промиелоцитарной HL-60, но в то же время не влияет на дифференцировку клеточной линии К-562 эритробластного лейкоза [44]. Интересно, что L-глутаминовая кислота не вызывает дифференцировку этой клеточной линии (рис. 6). Полученные нами данные о значительном увеличении числа рецепторов TNF- β на клетках HL-60 после 12-часовой предынкубации с L-глутаминовой кислотой указывают на то, что TNF играет важную роль и в дифференцировке клеток этой линии по гранулоцитарному пути.

Несмотря на то что данные об участии IL-2 в процессе дифференцировки клеток линии HL-60 и других лейкозных линий отсутствуют, мы изучили рецепцию $[^{125}\text{I}]\text{rHuIL-2}$ клетками HL-60 и влияние на этот процесс L-глутаминовой кислоты. Полученное без предварительной обработки клеток L-глутаминовой кислотой значение K_d (3.6×10^{-8} М) (рис. 7, 1) соответствует таковому для низкоаффинного рецептора IL-2 p55 (α -субъединица) [45–47]. Предынкубация клеток в течение ночи с L-глутаминовой кислотой в концентрации 10^{-7} М практически не влияла на параметры связывания: K_d 3.6×10^{-8} М и n 3.0×10^5 (рис. 7, 2).

Представленный результат свидетельствует о том, что IL-2 не участвует в дифференцировке клеток линии HL-60 в гранулоциты, индуцированной L-глутаминовой кислотой.

Таким образом, данные, полученные нами, позволяют предположить, что L-глутаминовая кислота обладает широким спектром действия на уровне не только нервной, но и иммунной системы. В пользу этой гипотезы говорят как имеющиеся сообщения о повышенном (в 3–4 раза)

содержании L-глутаминовой кислоты в крови опухолевых больных по сравнению с кровью здоровых доноров, так и тот факт, что L-глутаминовая кислота подавляет митогенстимулированную пролиферацию лимфоцитов и снижает функциональную активность гранулоцитов, моноцитов и макрофагов *in vitro* [48, 49].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: рекомбинантный человеческий интерлейкин-1 β , рекомбинантный человеческий фактор некроза опухоли- β , рекомбинантный человеческий интерлейкин-2, L-глутаминовую кислоту, L-аспарагиновую кислоту, L-глутамин, RPMI 1640, фетальную сыворотку телят (Sigma, США); триптон, дрожжевой экстракт, бакто-агар (Difco, США); 1,3,4,6-тетрахло-ро-3 α ,6 α -дифенилгликолюрил (иодоген) (Pierce, США); N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновую кислоту (HEPES) (Fluka, США); L-[6- 3 H]Glu, удельная активность 56 Ки/ммоль; Na 125 I без носителя в NaOH (100 мКи/мл; Amersham Corp., Англия).

Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч. Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы Mono-Q (Millipore, США).

Транс-ретиноевая кислота была любезно предоставлена А.Н. Ходоновым (Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова), а клеточные линии HL-60 и K-562 – Р.Г. Васильевым (Институт биотехнологии, Москва).

Культивирование клеток. Клетки HL-60 и K-562 культивировали в атмосфере 5% CO $_2$ при 37° С в среде RPMI 1640, содержащей 7% фетальной сыворотки телят.

Дифференцирующую активность определяли по способности восстанавливать нитроголубой тетразолий (NBT-тест) [50]. L-Глутаминовую кислоту либо добавляли к клеткам в виде водного раствора, либо предварительно растворяли в культуральной среде, содержащей 10% фетальной сыворотки телят. Дифференцирующую активность на 4-е сут после добавления индуктора определяли по числу NBT-положительных клеток (в процентах). NBT-положительными считали клетки, содержащие не менее 10 гранул.

Низкомолекулярный фактор дифференцировки идентифицировали с помощью реакции дансирования без последующего гидролиза [51], аминокислотного анализа и масс-спектрометрическим методом с ионизацией бомбардировкой ускоренными атомами.

Фракции плазматических мембран и ядер клеток HL-60 получали как описано в работе [52].

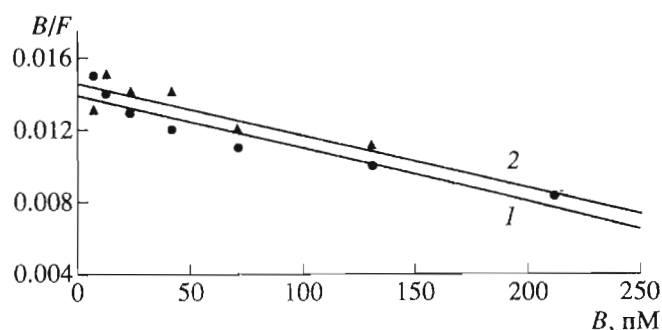


Рис. 7. Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания [125 I]rHuIL-2 с клетками HL-60 в нормальных условиях (1 – K_d 3.6×10^{-8} М, n 2.8×10^5) и в присутствии 0.1 мкМ L-глутаминовой кислоты (2 – K_d 3.6×10^{-8} М, n 3.0×10^5).

Концентрацию белка во фракциях определяли по методу [53].

Иодирование rHuIL-1 β и rHuIL-2 проводили по методу [54] с помощью иодогена. Для введения 125 I в rHuTNF- β использовали модифицированный иодоген-метод [55]. Удельная активность полученных препаратов составляла (Ки/ммоль): 94 – [125 I]IL-1 β , 254 – [125 I]TNF- α , 162 – [125 I]IL-2.

Связывание L-глутаминовой кислоты с клетками HL-60 изучали по следующей схеме: по 10^6 клеток в каждой пробе (или соответствующее количество мембранной или ядерной фракции) инкубировали с L-[6- 3 H]Glu (10^{-10} – 10^{-5} М) в 1 мл среды RPMI 1640 без аминокислот, содержащей 2 мМ NaN $_3$ и 10 мМ HEPES, pH 7.5, при различной температуре (0, 23, 37°С) в течение 30 мин, 1 или 2 ч. По окончании инкубации реакционную смесь фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/C (Whatman, UK, Англия). Радиоактивность на фильтрах подсчитывали с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика (Rack-Beta LKB Wallac, Швеция). Равновесные константы диссоциации (K_d) и плотность рецепторов рассчитывали по методу [56].

Связывание [125 I]rHuIL-1 β (4° С, 90 мин) [32] и [125 I]rHuIL-2 (37° С, 15 мин) [47] с клетками HL-60 проводили в 1 мл среды RPMI 1640, содержащей 10 мМ HEPES, pH 7.5. Неспецифическое связывание меченого цитокина определяли в присутствии 0.1 мМ соответствующего немеченого цитокина.

Связывание [125 I]rHuTNF- β с клетками HL-60 изучали по методу [55]. Клетки (10^6 /проба) инкубировали 120 мин при 37° С с [125 I]rHuTNF- β (10^{-12} – 10^{-6} М) в 1 мл среды RPMI 1640. Затем реакционную смесь фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/C. Радиоактивность на фильтрах измеряли с помощью счетчика Rack-Beta gamma-counter (LKB, Швеция). Неспецифическое связывание меченого цитокина определя-

ли в присутствии 10^{-5} М немеченого цитокина. Полученные результаты обрабатывали по методу [56].

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 97-04-49462) и Международного научно-технического центра (проект 463).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Collins S.J., Ruscetti F.W., Gallagher R.E., Gallo R.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. P. 2458–2462.
- Collins S.J., Ruscetti F.W., Gallagher R.E., Gallo R.C. // J. Exp. Med. 1979. V. 149. P. 969–974.
- Imaizumi M., Breitman T.R. // Eur. J. Haematol. 1987. V. 38. P. 289–302.
- Breitman T.R., Selonic S.E., Collins S.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 2936–2940.
- Douer D., Koeffler H.P. // J. Clin. Invest. 1982. V. 69. P. 277–283.
- McCarthy D.M., San Miguel J.F., Freake H.C. // Leuk. Res. 1983. V. 7. P. 51–55.
- Rovera G., Santoli D., Damsky C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 2779–2783.
- Miyawa C., Abe E., Kuribayashi T., Tamaka H., Kouno K., Nishi Y., Suda T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1981. V. 102. P. 937–941.
- Lotem J., Sacks L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 5158–5162.
- Aggarwal B.B., Moffat B., Harkins R.N. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. P. 686–690.
- Tamatani T., Kimura S., Hashimoto T., Onozaki K. // J. Biochem. 1989. V. 105. P. 55–60.
- Bhalla A.K., Paavonen T., Williams M.M., Delves P.J., Lydyard P.M. // Immunology. 1991. V. 72. P. 61–64.
- Kestler D.P., Agarwal S., Hall R.E. // Immunology. 1995. V. 86. P. 463–468.
- Костанян И.А., Астапова М.В., Старовойтова Е.В., Драницына С.М., Липкин В.М. // Биоорг. химия. 1995. Т. 21. С. 243–248.
- Kostanyan I.A., Astapova M.V., Starovoytova E.V., Dranitsina S.M., Lipkin V.M. // FEBS Lett. 1994. V. 356. P. 327–329.
- Leftwich J.A., Hall R.E. // Cancer Res. 1989. V. 49. P. 4459–4465.
- Leftwich J.A., Hall R.E. // J. Leuk. Biol. 1990. V. 47. P. 87–92.
- Kostanyan I.A., Merkulova M.I., Navolotskaya E.V., Nurieva R.I. // Immunol. Lett. 1997. V. 58. P. 177–180.
- Motsushima K., Copeland T.D., Onozaki K., Oppenheim J.J. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 3435–3439.
- Le J., Vilcek J. // Lab. Invest. 1987. V. 56. P. 234–248.
- Bachwich P.R., Chensue S.W., Larrick J.W., Kunkel S.L. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986. V. 136. P. 94–101.
- Dinarello C.A. // Blood. 1991. V. 7. P. 1627–1652.
- Ucla C., Roux-Lombard P., Fey S., Dayer J.M., Mach B. // J. Clin. Invest. 1990. V. 85. P. 185–189.
- Harris P., Ralph P. // J. Leuk. Biol. 1985. V. 37. P. 407–422.
- McMahan C.J., Slack J.L., Mosley B., Cosman D., Lupton S.D., Brunton L.L., Grubin C.E., Wignall J.M., Jenkins N.A., Brannan C.I., Copeland N.G., Huebner K., Croce C.M., Cannizzaro L.A., Benjamin D., Dower S., Spriggs M.K., Sims J.E. // EMBO J. 1991. V. 10. P. 2821–2832.
- Dinarello C.A. // Blood. 1996. V. 87. P. 2095–2147.
- Greenfeder S.A., Nunes P., Kwee L., Labow M., Chizzonite R.A., Ju G. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 13757–13765.
- Colotta F., Dower S.K., Sims J.E., Mantovani A. // Immunol. Today. 1994. V. 15. P. 562–566.
- Onozaki K., Tamatani T., Hashimoto T., Matsushima K. // Cancer Res. 1987. V. 47. P. 2397–2402.
- Onozaki K., Urawa H., Tamatani T., Iwamuta Y., Hashimoto T., Baba T., Suzuki H., Matsushima K. // J. Immunol. 1988. V. 140. P. 112–119.
- Liu Z., Hsu H., Goeddel D.V., Karin M. // Cell. 1996. V. 87. P. 565–576.
- Holtman H., Wallach D. // J. Immunol. 1987. V. 139. P. 1161–1167.
- Hobmann H.P., Remy R., Brockhaus M., van Loon A.P.G.M. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 14927–14934.
- Smith C.A., Farrah T., Goodwin R.G. // Cell. 1994. V. 76. P. 959–962.
- Tartaglia L.A., Goeddel D.V. // Immunol. Today. 1992. V. 13. P. 151–153.
- Brockhaus M., Schoenfeld H.-J., Schlaeger E.-J., Hunziker W., Lesslauer W., Loetscher H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 3127–3131.
- Loetscher H., Pan Y.-C.E., Lahm H.-W., Gentz R., Brockhaus M., Tabuchi H., Lesslauer W. // Cell. 1990. V. 61. P. 351–359.
- Schall T.J., Lewis M., Koller K.J., Lee A., Rice G.C., Wong G.H.W., Gatanaga T., Granger G.A., Lentz R., Raab H., Kohr W., Goeddel D.V. // Cell. 1990. V. 61. P. 361–370.
- Smith C.A., Davis T., Anderson D., Solam L., Beckmann M.P., Jerzy R., Dower S.K., Cosman D., Goodwin R.G. // Science. 1990. V. 248. P. 1019–1023.
- Aggarwal B.B., Moffat B., Harkins R.N. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. P. 686–691.
- Tracey K.J., Ceramy A. // Annu. Rev. Cell Biol. 1993. V. 9. P. 317–343.
- Vandenabeele P., Declercq W., Beyaert R., Fiers W. // Trends Cell Biol. 1995. V. 5. P. 392–399.
- Ishikura H., Hori K., Bloch A. // Blood. 1989. V. 73. P. 419–424.
- Takeda H., Iwamoto S., Sugimoto H., Takuma T., Kawatani N., Noda M., Masaki A., Morise H., Arimura H., Konno K.J. // Nature. 1986. V. 323. P. 338–340.
- Pallard M., Mishail Z. // Methods Immunotoxicol. 1995. V. 1. P. 277–293.
- Takeshita T., Asao H., Ohtani K., Ishii N., Kumaki S., Taraka N., Marikata H., Takamura M., Sugamura K. // Science. 1992. V. 257. P. 379–382.
- Taniguchi T., Minami Y. // Cell. 1993. V. 73. P. 5–8.

48. Droge W., Eck H.-P., Betzler M., Schlag P., Drings P., Ebert W. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1988. V. 114. P. 124–128.
49. Eck H.-P., Frey H., Droge W. // *Int. Immunol.* 1989. V. 1. P. 367–372.
50. Baehner R.L., Nathan D.G. // *J. Med.* 1968. V. 278. P. 971–976.
51. Gray W.R. // *Methods Enzymol.* 1967. V. 11. P. 139–147.
52. Naldini L., Cirillo D., Moody T.W., Comoglio P., Schlessinger J., Kris R. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. P. 5153–5160.
53. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
54. Salacinski P.R.P., McLean C., Sykes J.E.C., Clement-Jones V.V., Lowry P. // *Anal. Biochem.* 1981. V. 117. P. 136–146.
55. Aggarwal B.B., Eessalu T.E., Hass P.E. // *Nature.* 1985. V. 318. P. 665–667.
56. Chang K.-J., Jacobs S., Cuatrecasas P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1975. V. 406. P. 294–303.

The Effect of *L*-Glutamic Acid on the Reception of Cytokines by HL-60 Cells

I. A. Kostanyan*, R. I. Nurieva**, E. V. Navolotskaya***, M. V. Astapova*,
S. M. Dranitsyna*, V. P. Zav'yalov***, and V. M. Lipkin*

* *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

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

*** *Institute of Engineering Immunology, Lyubuchany, Moscow oblast, 142380 Russia*

Abstract—*L*-Glutamic acid at a concentration of 0.1 μM was found to induce differentiation of the cell line of HL-60 promyelocytic leukemia into granulocytes or neutrophils. The HL-60 cells have no specific glutamate-binding sites, but *L*-glutamic acid influences the reception of several cytokines by these cells. At a concentration of 0.1 μM , *L*-glutamic acid completely inhibits the high-affinity binding of ^{125}I -labeled human recombinant interleukin-1 β ($K_d = 0.32$ nM) to the HL-60 cells, but does not affect their low-affinity binding ($K_d = 13.3$ nM) and does not change the total number of the IL-1 β -binding sites. Preincubation of the HL-60 cells with 0.1 μM of *L*-glutamic acid increases 2.5 times the number of receptors for ^{125}I -labeled human recombinant tumor necrosis factor β . These results suggest that *L*-glutamic acid plays an important role in the differentiation of the blood myeloid cells.

Key words: *L*-glutamic acid, interleukin-1, tumor necrosis factor, receptors, differentiation.