



УДК 576.314.6

## ЭНДОГЕННЫЙ ФАКТОР НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ ДЕМАСКИРУЕТ НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ ЦЕНТРЫ СВЯЗЫВАНИЯ *N*-АЦЕТИЛГЛЮКОЗАМИНИЛ-( $\beta$ 1-4)-*N*-АЦЕТИЛМУРАМОИЛ-АЛАНИЛ-*D*-ИЗОГЛУТАМИНА

© 2001 г. Е. Э. Петрова, Т. И. Валякина, С. В. Хайдуков, В. А. Несмеянов<sup>#</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 20.11.2000 г. Принята к печати 09.02.2001 г.

Показано, что на поверхности клеток меланомы BRO присутствуют центры связывания *N*-ацетилглюкозаминил-( $\beta$ 1-4)-*N*-ацетилмурамоил-аланил-*D*-изоглутамина (GMDP). Определены их число ( $1500 \pm 200$  на клетку) и аффинность ( $K_d 10 \pm 1.2$  нМ). Наличие этих центров коррелирует со способностью меланомных клеток отвечать *in vitro* на воздействие GMDP повышением экспрессии меланоассоциированных антигенов (МАО). Повышенное число центров связывания GMDP ( $5200 \pm 500$  на клетку) обнаруживается при действии на клетки меланомы BRO фактора некроза опухолей  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ). Наиболее вероятно, что механизм действия ФНО- $\alpha$  включает демаскирование предсуществующих на клеточной поверхности центров связывания GMDP путем активации эндогенной протеиназы и гидролиза ею поверхностных белков, в частности, высокогликозилированного белка LAMP-2, экспонированного на плазматической мембране клеток BRO.

*Ключевые слова:* меланома; фактор некроза опухолей альфа; белок LAMP-2; рецепторы GMDP; демаскирование.

### ВВЕДЕНИЕ

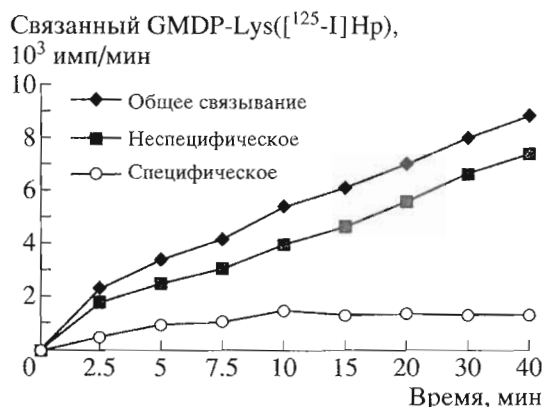
Перспективным направлением в области терапии опухолей является использование природных или синтетических агентов, не только стимулирующих иммунитет, но и направленно изменяющих поверхностные структуры самих опухолевых клеток, приводя тем самым к усилению иммунного ответа. К числу таких агентов может быть отнесен *N*-ацетилглюкозаминил-( $\beta$ 1-4)-*N*-ацетилмурамоил-аланил-*D*-изоглутамин (GMDP) – фрагмент бактериальной клеточной стенки, обладающий противоопухолевой активностью [1].

Ранее нами было показано [2, 3], что GMDP модулирует экспрессию ряда антигенов, находящихся на поверхности опухолевых клеток человека различной этиологии (аденокарциномы легкого А-549, карциномы толстой кишки WIDR, карциномы молочной железы MaTi и меланомы BRO). К таким антигенам относятся характерные для вышеперечисленных клеток опухолеассоциированные антигены, молекулы адгезии, антигены главного комплекса гистосовместимости II класса, молекулы мембраносвязанного интерлейкина  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) и фактора некроза опухолей  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ). Изменения антигенного спектра поверхности, индуцированные GMDP, оказались функционально значимы: они влияли на чувствительность опухолевых клеток к цитолизу аллогенными мононуклеарными клетками крови *in vitro* [2].

При изучении влияния мурамоилпептидов на экспрессию антигенов поверхности клеток меланомы BRO, культивируемых *in vitro*, было показано, что в ранние сроки после введения GMDP в культуру клеток происходило резкое снижение экспрессии меланоассоциированных антигенов (МАО) MUC-18 и MCA-C1, а именно, снижение числа МАО-несущих клеток и плотности антигенов на клеточной поверхности. Далее экспрессия МАО повышалась, достигая своего максимального значения к 24 ч, а к 72 ч экспрессия возвращалась к исходному уровню. Дозовая зависи-

Сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; GMDP – *N*-ацетилглюкозаминил-( $\beta$ 1-4)-*N*-ацетилмурамоил-аланил-*D*-изоглутамин; GMDP-Lys( $^{125}$ I)Hr – GMDP-[ $N^{\epsilon}$ -3-(4-гидрокси-[ $^{125}$ I]йодофенил)пропионил]-Lys; GMDP-Lys(Fic) – GMDP-( $N^{\epsilon}$ -флуоресцеинтиокарбамоил)-Lys; HEPES – *N*-(2-гидроксиэтил)пиперазин-*N*-2-этансульфоновая кислота; IL- $1\beta$  – интерлейкин- $1\beta$ ; LAMP-2 – мембранный ассоциированный с лизосомами белок-2; PBS – фосфатно-солевой буфер, pH 7.4; PMSF – фенолметилсульфонилфторид; МАО – меланоассоциированные антигены; ФНО- $\alpha$  и р-ФНО- $\alpha$  – нативный и рекомбинантный фактор некроза опухолей- $\alpha$ ; ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка.

<sup>#</sup>Автор для переписки (факс: (095) 330-59-74; e-mail: vnese@ibch.ru).



**Рис. 1.** Кинетика связывания GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr) с клетками меланомы BRO. GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr) (4 нМ) инкубировали при 4°C с клетками меланомы в различные интервалы времени в 10 мМ HEPES (pH 7.2), содержащем 0.01% азид Na. Неспецифическое связывание определяли в присутствии избытка немеченого GMDP-Lys (100 мкМ). Число клеток  $1.2 \times 10^6$  на каждую точку. Приведены средние величины из трех экспериментов. Стандартное отклонение не превышает 10%,  $P < 0.05$ .

мость действия GMDP при первичном введении имела колоколообразный характер с максимумом при 0.14 мкМ. Значительная часть клеток, изначально не несущих МАА, оставалась рефракторной к действию GMDP. Однако число отвечающих на GMDP клеток существенно возрастало при повторном введении GMDP в культуру, причем, как и при первичном воздействии мурамоилпептида, минимальное время, через которое гликопептид индуцировал дополнительную экспрессию МАА, составляло 24 ч [4].

Двухфазный характер индукции экспрессии МАА позволил предположить наличие в составе популяции клеток, качественно различающихся в ответе на воздействие GMDP: одни клетки изначально были готовы к ответу на мурамоилпептид, другие не отвечали на первичное введение GMDP и нуждались в дополнительном стимуле. Таким стимулятором являлся ФНО- $\alpha$  [5]. Клетки меланомы BRO были способны к биосинтезу ФНО- $\alpha$ , и первичное добавление GMDP приводило к высвобождению эндогенного цитокина. Сам ФНО- $\alpha$  непосредственно не модулировал экспрессию опухолеассоциированных антигенов на клетках меланомы, а активировал ранее неответающие клетки, в результате чего дополнительная популяция клеток приобретала чувствительность к GMDP. В настоящей работе изучался механизм индуцирующего экспрессию МАА действия GMDP на клетки меланомы BRO.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мурамоилпептиды реализуют свое действие на нормальные и трансформированные клетки посредством рецепторного механизма. Центры специфического связывания с высокой аффинностью обнаружены на поверхности и внутри макрофагов и других клеток [6–10]. Было показано, что внутриклеточные центры связывания макрофагов участвуют в проведении биологического сигнала [11]. Функциональная роль мембранных центров остается неясной. Тем не менее существуют факты, указывающие на значимость этого связывания. Так, рецепция мурамоилдипептида на поверхностных центрах связывания В-лимфоцитов на поздней стадии их дифференцировки в плазматические клетки индуцирует усиление их антителообразующей активности *in vitro* [12]. Действие на моноциты пептидогликана, фрагментом которого является GMDP, а именно активация продукции цитокинов, в частности ИЛ-6, опосредуется связыванием пептидогликана с поверхностным рецептором CD14 [13]. Минимальной структурой, ответственной за связывание пептидогликана с CD14, является мурамоилдипептид [14].

Закономерно было предположить, что действие GMDP на опухолевые клетки человека также может осуществляться посредством рецепторного механизма, в связи с чем методом радиолигандного анализа было изучено специфическое связывание GMDP с клетками меланомы BRO. Меченое производное GMDP (GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr)) с высокой удельной активностью (2000 Ки/ммоль) было синтезировано по методике работы [15]. Ранее было показано, что производные GMDP-Lys с модифицированной  $\epsilon$ -аминогруппой лизина сохраняли биологическую активность, идентичную GMDP [16]. Чтобы ограничить эндоцитоз, меченые клетки проводили при 4°C в присутствии азид-натрия.

При подборе оптимальных условий анализа определяли зависимость величины специфического связывания GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr) от времени инкубации с меланомными клетками (рис. 1). Величиной специфического связывания считали разность между общим связыванием (количество радиоактивности, сорбированной при инкубации с GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr)) и неспецифическим связыванием (количество радиоактивности, сорбированной при инкубации с GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr) в присутствии более чем 4000-кратного избытка немеченого GMDP-Lys).

Из рис. 1 видно, что общее и неспецифическое связывание GMDP-Lys([<sup>125</sup>I]Hr) с клетками меланомы устойчиво возрастало при увеличении времени инкубации, в то же время специфическое связывание практически не изменялось уже после 10 мин инкубации. С целью унификации усло-

**Таблица 1.** Изменение параметров связывания GMDP-Lys(Ftc) клетками BRO, индуцированное ФНО- $\alpha$ \*

Условия связывания GMDP-Lys(Ftc)**		Число GMDP-Lys(Ftc)-позитивных клеток, %	
		интактных	обработанных р-ФНО- $\alpha$
4°C	А	15.2 (2.86)	24.8 (3.67)
	Б	0.8 (1.27)	1.5 (1.45)
20°C	А	18.4 (3.61)	26.2 (4.26)
	Б	4.8 (1.79)	8.6 (2.10)

\* Приведены средние величины из 3–5 экспериментов. В скобках представлены величины средней интенсивности флуоресценции. Стандартное отклонение не превышает 10%,  $P < 0.05$ .

\*\* А – без гашения флуоресценции; Б – с гашением флуоресценции после связывания.

вий и достижения максимально низкого неспецифического связывания все эксперименты по изучению связывания проводили при тринадцатиминутной инкубации клеток с лигандом.

Зависимость специфического связывания GMDP с поверхностью клеток от концентрации лиганда изучали двумя способами. В первом оценивали связывание радиоактивного лиганда в присутствии возрастающего количества GMDP-Lys (рис. 2); во втором при неизменной избыточной концентрации немеченого лиганда, выполняющего роль ингибитора, оценивали эффективность связывания в зависимости от дозы меченого производного GMDP (рис. 3). В первом случае отмечено отсутствие специфического связывания при соотношении концентраций немеченого и меченого производного GMDP более 375 : 1 (3000 и 8 нМ). Исходя из этого при определении неспецифического связывания холодный GMDP-Lys был использован более чем в 375-кратном избытке. Максимальная концентрация  $^{125}\text{I}$ -меченого производного GMDP, используемая нами при построении графика зависимости специфического связывания GMDP с клетками от концентрации свободного GMDP, составляла 24 нМ (см. рис. 3), из чего следовало, что достаточное количество холодного GMDP-Lys должно было быть равным или выше 9 мкМ.

Несмотря на то что эксперименты проводились на холоду в присутствии азида натрия, нельзя было исключить проникновения меченого GMDP-Lys внутрь клеток BRO. Чтобы прояснить этот вопрос, был использован метод проточной цитофлуориметрии с гашением флуоресценции, позволяющий отличить поверхностную локализацию меченных флуорофором соединений от внутриклеточной. С этой целью был синтезирован GMDP-Lys(Ftc).

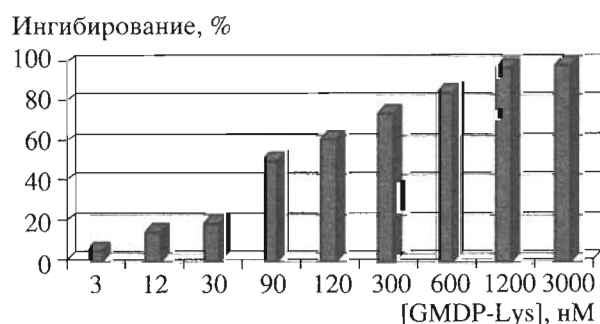
Меланомные клетки инкубировали с GMDP-Lys(Ftc) при комнатной температуре или при 4°C в присутствии азида натрия. Перед проведением цитофлуориметрического анализа в опытные образцы для гашения поверхностной флуоресценции добавляли трипановый синий. Было обнаруже-

но (табл. 1), что при 4°C в присутствии азида натрия GMDP-Lys(Ftc) связывался с поверхностью меланомных клеток и практически не проникал внутрь. При комнатной температуре GMDP-Lys(Ftc) в отсутствие азида натрия не только связывался с поверхностью меланомных клеток, но и проникал внутрь, хотя за время наблюдения (30 мин) активного эндоцитоза не наблюдалось.

Таким образом, выбранные условия анализа позволяли оценить связывание радиоактивно меченого GMDP-Lys именно с мембранными рецепторами.

Построение графика зависимости специфического связывания GMDP-Lys( $^{125}\text{I}$ Нр) с клетками от концентрации свободного лиганда (рис. 3), позволило нам рассчитать, используя программу Oridgin 5.0 (MicroCal, Inc.), константу диссоциации лиганд-рецепторного комплекса и количество участков связывания на клетку (рис. 3). Для интактных клеток меланомы BRO величина  $K_d$  составила  $10 \pm 1.2$  нМ, а число центров специфического связывания  $B_{\text{max}}$   $1500 \pm 200$  на клетку. Такие же результаты были получены при построении графика в координатах Скэтчарда.

Каскадный характер вовлечения меланомных клеток в ответ на GMDP при последовательном двукратном воздействии модулятора может яв-



**Рис. 2.** Ингибирование связывания GMDP-Lys( $^{125}\text{I}$ Нр) с клетками меланомы BRO GMDP-Lys. Приведены средние величины из трех экспериментов. Стандартное отклонение не превышает 10%,  $P < 0.05$ .

**Таблица 2.** Влияние ингибитора сериновых протеиназ PMSF на экспрессию меланоассоциированных антигенов MCA-C1, MUC-18 и центров специфического связывания GMDP, индуцированную ФНО- $\alpha$  и GMDP\*

Условия эксперимента	Число клеток (%), несущих		
	MCA-C1	MUC-18	центры специфич. связывания GMDP**
Интактные клетки	20 (4.80)	15 (4.55)	5% (2.30) 1500 центров/клетку
Клетки, обработанные р-ФНО- $\alpha$	45 (5.60)	30 (5.05)	15% (2.95) 5200 центров/клетку
Клетки, обработанные р-ФНО- $\alpha$ в присутствии PMSF	28 (4.95)	20 (4.65)	5% (2.35) 1500 центров/клетку

\* Использовали PMSF в концентрации 20 мкг/мл. Приведены средние величины из 3–5 экспериментов. В скобках представлены величины средней интенсивности флуоресценции. Стандартное отклонение не превышает 10%,  $P < 0.05$ .

\*\* Данные радиолигандного анализа.

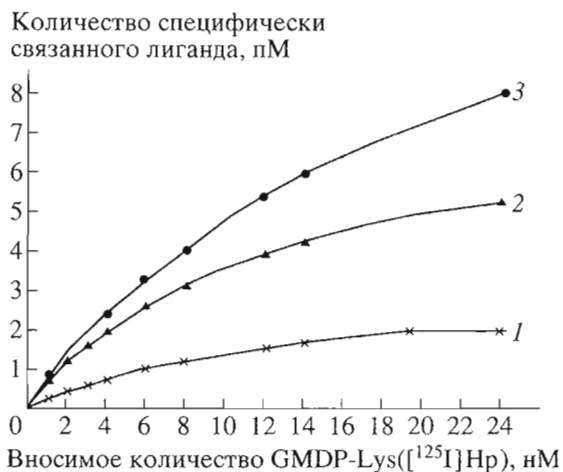
ляться результатом различной представленности специфических центров связывания GMDP на гетерогенной популяции меланомных клеток, а именно: в популяции могли присутствовать и клетки, несущие центры связывания GMDP, и клетки, на которых такие центры исходно отсутствовали. Поэтому было проведено сравнение числа и аффинности специфических центров связывания GMDP на интактных клетках и клетках, обработанных ФНО- $\alpha$ . Как следует из данных, приведенных на рис. 3, для клеток, обработанных р-ФНО- $\alpha$ , значение  $K_d$  составляло  $14 \pm 1$  нМ, а число центров специфического связывания  $5200 \pm 500$  на клетку. Следовательно, значение  $K_d$  для клеток,

обработанных р-ФНО- $\alpha$ , незначительно отличается от  $K_d$  для интактных клеток, в то время как после обработки ФНО- $\alpha$  число центров связывания увеличивается более чем в 3 раза. Следует отметить, что  $K_d$  центров связывания GMDP у макрофагов мыши была близка по величине и составляла 20 нМ [6].

Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что р-ФНО- $\alpha$  индуцирует на поверхности клеток появление дополнительных центров специфического связывания GMDP.

В ряде экспериментов дополнительные специфические центры связывания GMDP индуцировали первичным воздействием на клетки GMDP. Такая обработка, как было показано ранее, приводила к выбросу в культуральную среду эндогенного ФНО- $\alpha$  в концентрации 100 ед./мл [5]. Увеличение числа рецепторов GMDP в этих условиях соответствовало повышению экспрессии, индуцированному аналогичной дозой р-ФНО- $\alpha$  (данные не приводятся), а также коррелировало с возрастанием числа МАА-экспрессирующих клеток в результате повторного действия GMDP [5]. Можно полагать, что этот эффект является результатом взаимодействия GMDP с индуцированными центрами связывания.

Радиолигандный анализ не позволяет определить, за счет какого процесса увеличивается число центров связывания: за счет увеличения плотности центров связывания GMDP на клеточной поверхности или за счет увеличения числа клеток, несущих эти центры, при сохранении прежней плотности. Однако данные, полученные нами методом проточной цитофлуориметрии с использованием FITC-меченого GMDP-Lys, позволяют утверждать, что при обработке клеток меланомы BRO р-ФНО- $\alpha$  имеют место оба процесса. Так, доля клеток, специфически связывающих FITC-меченый GMDP-Lys, составляла  $5 \pm 1\%$  для интактных клеток и  $15 \pm 3\%$  для клеток, обработан-



**Рис. 3.** Влияние ФНО- $\alpha$  или кратковременной обработки трипсином на экспрессию центров специфического связывания GMDP. Приведены средние величины из трех экспериментов. Стандартное отклонение не превышает 10%,  $P < 0.05$ . 1 – интактные клетки,  $K_d = 10 \pm 1.2$  нМ,  $B_{max} = 1500 \pm 200$  центров/клетку; 2 – клетки, обработанные р-ФНО- $\alpha$ ,  $K_d = 14 \pm 1$  нМ,  $B_{max} = 5200 \pm 500$  центров/клетку; 3 – клетки, обработанные трипсином,  $K_d = 18.1 \pm 1$  нМ,  $B_{max} = 7900 \pm 900$  центров/клетку.

ных р-ФНО- $\alpha$  (табл. 2). Среднее число центров связывания GMDP после обработки р-ФНО- $\alpha$  на отдельной клетке также возрастало, о чем свидетельствует увеличение интенсивности флуоресценции (mean) с  $2.30 \pm 0.23$  до  $2.95 \pm 0.29$  (табл. 2). Низкий процент клеток, детектируемый методом проточной цитофлуориметрии, может быть связан с низкой чувствительностью цитофлуориметрического анализа. Субпопуляция с низкой представленностью центров связывания, по-видимому, не выявлялась проточной цитофлуориметрией.

Число клеток, несущих центры специфического связывания меченого GMDP, зависело от концентрации вносимого р-ФНО- $\alpha$ . На рис. 4 приведена зависимость числа (%) клеток меланомы BRO, несущих центры специфического связывания FITC-меченого GMDP, от количества внесенного р-ФНО- $\alpha$  в интервале концентраций от 10 до 200 ед./мл. Оптимальная доза р-ФНО- $\alpha$  составляла 100 ед./мл. Та же доза р-ФНО- $\alpha$  являлась оптимальной в условиях индукции GMDP дополнительной экспрессии МАА. Концентрация эндогенного ФНО- $\alpha$ , накапливающегося в культуральной среде вследствие первичного введения GMDP и индуцирующего дополнительную экспрессию МАА совместно со второй дозой GMDP, также составляла 100 ед./мл [5].

По данным проточной цитофлуориметрии, полученным с использованием GMDP-Lys(Ftc), для индукции центров специфического связывания р-ФНО- $\alpha$  требовалось относительно короткое время инкубации с цитокином (30 мин) (рис. 5). Это обстоятельство давало основание предположить, что механизм появления новых центров может быть обусловлен транспортом ранее синтезированных молекул из внутриклеточного депо или демаскированием предсуществующих мембранных центров связывания.

Ранее [3] нами было показано, что на поверхности клеток меланомы BRO экспрессируется высокомолекулярный гликопротеин LAMP-2, присутствующий в нормальных клетках в лизосомах и защищающий лизосомную мембрану от действия лизосомных ферментов. Существуют данные о возможном участии подобных высокогликозилированных молекул, например, эписиалина и эпигликанина в случае карцином, в маскировании поверхностных детерминант опухолевых клеток [17, 18]. Подобный механизм с участием молекул LAMP-2, маскирующих поверхностные антигены клеток, мог реализовываться и в случае меланомы BRO. Свидетельством в пользу этого являлись полученные нами данные об обратной корреляции индуцированного совместным действием GMDP и ФНО- $\alpha$  возрастания экспрессии МАА и снижения уровня экспрессии LAMP-2 (неопубликованные данные). Поскольку существуют литературные данные,

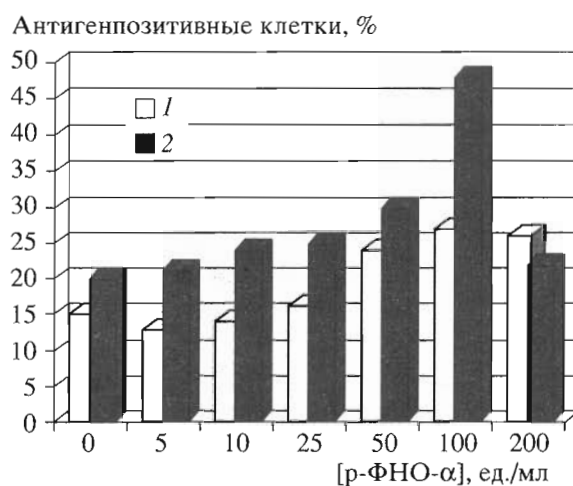


Рис. 4. Зависимость экспрессии клетками меланомы BRO центров связывания GMDP (1) и МАА МСА-С1 (2) от концентрации р-ФНО- $\alpha$ . Число GMDP-Lys(Ftc)-позитивных клеток оценивали через 2 ч инкубации с ФНО- $\alpha$ . Число МСА-С1-позитивных клеток оценивали через 24 ч инкубации с ФНО- $\alpha$  и GMDP. Приведены средние величины из 3–5 экспериментов. Стандартное отклонение не превышает 10%,  $P < 0.05$ .



Рис. 5. Кинетика индуцированного ФНО- $\alpha$  возрастания числа клеток меланомы BRO, несущих центры связывания GMDP.

согласно которым в механизме противоопухолевого цитотоксического действия ФНО- $\alpha$  задействованы сериновые протеиназы [19], возможно, что в процессе демаскирования скрытых под молекулами гликокаликса антигенов участвуют эндогенные сериновые протеиназы, активируемые ФНО- $\alpha$ . Действительно, было показано (табл. 2), что ингибитор сериновых протеиназ PMSF отменял влияние ФНО- $\alpha$  как на экспрессию МАА, так и на индукцию центров специфического связывания GMDP.

В то же время краткосрочная обработка трипсином интактных клеток меланомы приводила к появлению дополнительного числа центров специфического связывания GMDP ( $B_{\max}$   $7900 \pm 900$  центров/клетку) с аффинностью ( $K_d$   $18.1 \pm 2.5$  нМ), сходной с аффинностью центров на интактных клетках (рис. 3), что свидетельствует о наличии в

культуре клеток меланомы BRO субпопуляции клеток с маскированными центрами связывания GMDP.

Полученные данные дают основание заключить, что в основе механизма праймирования меланомных клеток к повторному действию GMDP лежит процесс индуцированного ФНО- $\alpha$  демаскирования поверхностных центров связывания GMDP, скорее всего, вследствие активации эндогенных протеолитических ферментов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали культуральные среды и другие составляющие ростовой среды фирмы Flow Laboratories, раствор трипсина 0.25% производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, пластиковую посуду фирмы Nunc.

Реактив Болтона–Хантера (эфир *N*-гидроксисукцинимид и 3-(*n*-гидроксифенил)пропиононовой кислоты) был получен от “Fluka” (Швейцария), хлорамин Т от “Serva” (Германия),  $\text{Na}^{125}\text{I}$  от “Изотоп” (Россия), FITC, BSA, азид Na и PMSF от “Sigma” (США).

*N*-Ацетилглюкозаминил-( $\beta$ 1-4)-*N*-ацетилмураоил-аланил-*D*-изоглутамин (GMDP) и GMDP-Lys были синтезированы в ИБХ РАН, Москва.

Рекомбинантный ФНО- $\alpha$  был любезно предоставлен Л.Н. Шингаровой и В.Г. Коробко (ИБХ РАН, Москва).

Моноклональные антитела мыши (АТСС НВ 8443) к меланомоассоциированным антигенам МСА-С1 были предоставлены Е.С. Ревазовой (ОНЦ РАМН, Москва), к МUC-18 – Ю.Д. Джонсон (Институт иммунологии, Университет Мюнхена). FITC-меченые антитела кролика к иммуноглобулину мыши были приобретены у фирмы “ДАКО” (Дания).

Меланома BRO была получена из коллекции клеточных культур ОНЦ РАМН, Москва.

**Культивирование клеток.** Клетки меланомы BRO культивировали в среде Dulbecco MEM/F12 НАМ (1 : 1), содержащей 10% ЭТС и 10 мкг/мл гентамицина. Клетки росли до монослоя в культуральных флаконах в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  при 37°C. С поверхности флаконов клетки снимали путем инкубации в течение 3 мин с раствором трипсина (0.25%) и EDTA (0.02%). После центрифугирования при 400g клеточный осадок суспендировали в полной культуральной среде из расчета  $2 \times 10^5$  клеток/мл. Клеточную суспензию с данной плотностью помещали в лунки 24-луночного планшета и инкубировали до образования монослоя (48 ч).

**Обработка клеток GMDP.** В клеточные культуры вносили GMDP в водном растворе. При первичной обработке использовали GMDP в конечной концентрации 0.14 мкМ, при повторном введе-

нии GMDP вносили в концентрации 28 мкМ через 24 ч после первичного добавления препарата.

**Обработка клеток р-ФНО- $\alpha$ .** Экспрессию МАА оценивали после 24-часовой инкубации с р-ФНО- $\alpha$  (3–200 ед./мл) в присутствии 28 мкМ GMDP при 37°C. Число центров специфического связывания GMDP оценивали после двухчасовой инкубации с р-ФНО- $\alpha$  (100 ед./мл).

**Обработка клеток трипсином.** Клетки освобождали от культуральной среды, трижды промывали бессывороточной средой Dulbecco/F12, после чего культуры инкубировали в 0.06% растворе трипсина в PBS в течение 1 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением ЭТС до 10%.

**Синтез  $^{125}\text{I}$ -меченого производного GMDP.** GMDP-Lys( $^{125}\text{I}$ Нр) был получен как было предложено ранее [15]. К 200 мкл 0.05 М Na-боратного буфера (рН 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 Болтона–Хантера в 150 мкл метанола. После инкубации в течение 30 мин при 20°C смесь разделяли на колонке Nucleosil 7C<sub>8</sub> (SS 250/1/20) в градиенте ацетонитрила (0–60%) в 0.1% аммонийно-трифторацетатном буфере (рН 3.5). Идентификацию полученного производного (GMDP-Lys(Нр)) проводили методами масс-спектрологии и ЯМР. Для йодирования к 15 мкл 0.25 М Na-фосфатного буфера (рН 7.5) добавляли 45 мкг (40 нмоль) GMDP-Lys(Нр) в 15 мкл 0.05 М Na-фосфатного буфера (рН 7.5), 1 мКи  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (2000 Ки/ммоль) в 8 мкл воды, 150 мкг (535 нмоль) хлорамин Т в 15 мкл 0.05 М Na-фосфатного буфера (рН 7.5) и через 1 мин 200 мкг (1000 нмоль)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  в 20 мкл того же буфера. Смесь разделяли на колонке Nucleosil 7C<sub>8</sub> в градиенте ацетонитрила (0–60%) в 0.1% аммонийно-трифторацетатном буфере (рН 3.5). Для идентификации целевого продукта проводили йодирование GMDP-Lys(Нр) с использованием холодного NaI и йодированное производное идентифицировали после хроматографии методом масс-спектрологии. Специфическая радиоактивность полученного препарата составляла (2000 Ки/ммоль).

**Связывание GMDP-Lys( $^{125}\text{I}$ Нр) с клетками.** Клетки помещали в 6-луночный планшет за 48 ч до проведения экспериментов по связыванию. В некоторых экспериментах пробы обрабатывали р-ФНО- $\alpha$  или трипсином как описано выше. Непосредственно перед анализом культуральную среду заменяли на 10 мМ HEPES (рН 7.2), содержащий 150 мМ NaCl, 2 мМ  $\text{MnCl}_2$ , 0.01% азид Na и 1% BSA (1 мл/лунку), и инкубировали с  $^{125}\text{I}$ -меченым производным GMDP в интервале его концентраций 0.4–24 нМ при 4°C в течение 13 мин. Клетки отмывали три раза тем же буфером и снимали 0.1% SDS. Радиоактивность проб определяли на универсальном  $\gamma$ -счетчике 1282-Compugamma (LKB-Wal-

лас, Швеция). Неспецифическое связывание оценивали в присутствии избытка немеченого GMDP-Lys (100 мкМ). Специфическое связывание считали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Число клеток (1 лунка планшета) —  $1.2 \times 10^6$  на каждую экспериментальную точку. Расчет производили по программе Oridgin 5.0 (MicroCal, Inc.).

**Кинетика связывания GMDP-Lys( $^{125}\text{I}$ )Hr) с клетками меланомы.**  $^{125}\text{I}$ -меченое производное GMDP (4 нМ) инкубировали при  $4^\circ\text{C}$  с клетками меланомы, распластанными в 24-луночном планшете, различные интервалы времени (2.5–40 мин) в 10 мМ HEPES (pH 7.2), содержащем 150 мМ NaCl, 2 мМ  $\text{MnCl}_2$ , 0.01% азид Na и 1% BSA. Клетки отмывали три раза тем же буфером и снимали 0.1% SDS. Неспецифическое связывание определяли в присутствии избытка немеченого GMDP-Lys (100 мкМ). Число клеток  $1.2 \times 10^6$  на каждую точку.

**Ингибиторный анализ связывания GMDP-Lys( $^{125}\text{I}$ )Hr) с клетками меланомы.**  $^{125}\text{I}$ -меченое производное GMDP (8 нМ) добавляли в пробы одновременно с немеченым GMDP-Lys (0.01–3 мкМ) и инкубировали в течение 13 мин при  $4^\circ\text{C}$  с клетками меланомы, распластанными в 24-луночном планшете, в 10 мМ HEPES (pH 7.2), содержащем 150 мМ NaCl, 2 мМ  $\text{MnCl}_2$ , 0.01 % азид Na и 1% BSA. Клетки отмывали три раза тем же буфером и снимали 0.1% SDS. Неспецифическое связывание определяли в присутствии избытка немеченого GMDP-Lys (100 мкМ). Число клеток  $1.2 \times 10^6$  на каждую точку.

**FITC-меченое производное GMDP** было получено конъюгированием FITC с GMDP-Lys описанным ранее методом [20]. Концентрацию GMDP-Lys(Ftc) определяли по поглощению при 495 нм, используя в качестве стандарта раствор FITC.

**Связывание GMDP-Lys(Ftc) с клетками меланомы** анализировали как было предложено ранее [6]. Клетки, интактные или обработанные р-ФНО- $\alpha$  или трипсином, осторожно снимали резиновым скребком с поверхности лунок 24-луночного планшета, трижды отмывали центрифугированием при 300g в течение 10 мин при  $4^\circ\text{C}$ . Для определения общего связывания полученную клеточную суспензию ( $2 \times 10^5$  клеток на пробу) инкубировали с 2 мкг GMDP-Lys(Ftc) в 100 мкл PBS/ЭТС с 0.01% азид Na при  $4^\circ\text{C}$  в течение 30 мин в темноте. После инкубации клетки трижды отмывали в PBS/ЭТС, суспендировали в 1 мл буфера и анализировали на цитофлуориметре EPICS "Elite" (Coulter, США).

Параллельно с определением общего связывания тестировали уровень неспецифического связывания. Для этого в пробу одновременно с GMDP-Lys(Ftc) вносили немеченый GMDP в концентрациях, в 1000, 500 раз превышающих концентрацию

меченого производного. Величину специфического связывания определяли как разность между общим и неспецифическим связыванием.

**Гашение флуоресценции** осуществляли согласно [21]. Клетки были обработаны GMDP-Lys(Ftc) (см. выше). Несвязавшуюся метку отмывали PBS/ЭТС, клетки переводили в 0.013 М цитратный буфер (pH 4.5), затем для определения уровня внутриклеточного связывания проводили гашение поверхностной флуоресценции, инкубируя клетки 30 с с 0.04% Туран-Blue (Gibco Europe). Пробы отмывали цитратным буфером, суспендировали в 0.5 мл буфера и анализировали на цитофлуориметре. Все процедуры проводили при  $4^\circ\text{C}$ . Параллельно тестировали уровень общего связывания, инкубируя контрольные клетки в цитратном буфере.

**Оценка уровня МАА-экспрессии клетками меланомы.** Клетки снимали резиновым скребком с поверхности лунок 24-луночного планшета, трижды отмывали центрифугированием при 300g в течение 10 мин при  $4^\circ\text{C}$ . Полученную клеточную суспензию ( $2 \times 10^5$  клеток на пробу) инкубировали с 2 мкг моноклональных антител мыши к МАА в 100 мкл PBS/ЭТС с 0.01% азид Na при  $4^\circ\text{C}$  в течение 30 мин в темноте. После двукратной отмывки буфером клетки вновь инкубировали 30 мин при  $4^\circ\text{C}$  с FITC-мечеными IgG кролика к иммуноглобулинам мыши в разведении 1 : 100. После инкубации клетки трижды отмывали в PBS/ЭТС, суспендировали в 1 мл буфера и анализировали на цитофлуориметре EPICS "Elite" (Coulter, США).

Для определения фонового уровня флуоресценции клеток анализировали контрольные культуры, которые обрабатывали только FITC-мечеными кроличьими антителами к иммуноглобулинам мыши.

**Статистическую обработку** проводили с помощью программы Statgraf. При этом для оценки достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 97-04-48774 и № 00-04-48682).

Авторы выражают глубокую признательность В.Г. Коробко и Л.Н. Шингаровой за предоставление рекомбинантного ФНО- $\alpha$  человека, Т.М. Андроновой и Е.А. Макарову за синтез GMDP-Lys, Е.С. Ревазовой за моноклональные антитела к MCA-C1-антигену.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andronova T.M., Ivanov V.T. // Sov. Med. Rev. Immunol. 1991. V. 4. P. 1–63.

2. Valyakina T., Malakhov A., Malakhova N., Petrova E., Bykovskaya S., Revazova E., Nesmeyanov V. // International J. Oncology. 1996. V. 9. P. 885–891.
3. Валякина Т.И., Малахов А.А., Комалева Р.Л., Петрова Е.Э., Михайлов А.Д., Ревазова Е.С., Несмеянов В.А. // Молекулярн. биология. 1996. Т. 30. С. 1394–1401.
4. Валякина Т.И., Малахов А.А., Макаров Е.Л., Андроронова Т.М., Ревазова Е.С., Несмеянов В.А., Иванов В.Т. // Иммунология. 1993. Т. 4. С. 32–36.
5. Valyakina T.I., Komaleva R.L., Petrova E.E., Malakhov A.A., Shamborant O.G., Andronova T.M., Nesmeyanov V.A. // FEBS Lett. 1998. V. 426. P. 373–376.
6. Sumaroka M., Litvinov I., Khaidukov S., Golovina T., Kamraz M., Komal'eva R., Andronova T., Makarov E., Nesmeyanov V., Ivanov V. // FEBS Lett. 1991. V. 295. P. 48–50.
7. Golovina T., Sumaroka M., Samokhvalova L., Shebzukhov Yu., Andronova T., Nesmeyanov V. // FEBS Lett. 1994. V. 356. P. 9–12.
8. Golovina T., Fattathova G., Swiderek K., Makarov E., Bovin N., Shively J., Nesmeyanov V. // FEBS Lett. 1999. V. 454. P. 152–156.
9. Fogler W., Fidler I. // J. Immunology. 1986. V. 136(6). P. 2311–2317.
10. Silverman D., Krueger J., Karnovsky M. // J. Immunol. 1986. V. 136. P. 2195–2201.
11. Nesmeyanov V.A., Golovina T.N., Khaidukov S.V., Shebzukhov Y.V. // Peptides in Immunology / Ed. C.H. Schneider. Chichester: John Wiley and Sons, 1996. P. 291–294.
12. Tenu J.-P., Adam A., Souvannavong V., Yapo A., Petit J.-F., Douglas K. // Int. J. Immunopharmac. 1989. V. 11(6). P. 653–661.
13. Weidemann B., Schletter J., Dziarski R., Kusumoto S., Steller F., Rietschel E.T., Flad H.D., Ulmer A.J. // Infect. Immun. 1997. V. 65. P. 858–864.
14. Dziarski R., Tapping R.I., Tobias P.S. // J. Biological Chem. 1998. V. 273(15). P. 8680–8690.
15. Kaydalov A.A., Utkin Yu.N., Andronova T.M., Tsetlin V.I., Ivanov V.T. // FEBS Lett. 1989. V. 248. P. 78–82.
16. Мецзяркова Е.А., Гурьянова С.В., Макаров Е.А., Андроронова Т.М., Иванов В.Т. // Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. С. 1157–1165.
17. van de Wiel-van Kemenade E., Ligtenberg M.J.L., de Boer A.J., Buijs F., Vos H.L., Melief C.J.M., Hilkens J., Figdor C.G. // J. Immunol. 1993. V. 151. P. 767–776.
18. Codrington J.F., Frim D.M. // Biomembrans. 1983. V. 11. P. 207–258.
19. Suffys P., Beyaert R., van Roy F., Fiers W. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 178. P. 257–265.
20. Johnson G.D. // Immunofluorescence: Antibodies. A Practical Approach / Ed. D. Catty. Oxford; New York; Tokyo: IRL Press, 1989. V. 41. P. 179–200.
21. Sahlin S., Hed J., Rundquist I. // J. Immunological Meth. 1983. V. 60. P. 115–124.

## Endogenous Tumor Necrosis Factor $\alpha$ Unmasks the Binding Sites for *N*-Acetylglucosaminyl-( $\beta$ 1-4)-*N*-Acetylmuramyl-Alanyl-*D*-Isoglutamine on the Surface of Melanoma Cells

E. E. Petrova, T. I. Valyakina, S. V. Khaidukov, and V. A. Nesmeyanov

e-mail: vnes@ibch.ru

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

The surface of the melanoma BRO cells was shown to contain binding sites for *N*-acetylglucosaminyl-( $\beta$ 1-4)-*N*-acetylmuramyl-alanyl-*D*-isoglutamine (GMDP). Their number ( $1500 \pm 200$  per cell) and affinity ( $K_d = 10 \pm 1.2$  nM) were determined. The occurrence of these sites was found to correlate with the ability of the melanoma cells to react *in vitro* with GMDP by increasing the expression of melanoma-associated antigens (MAA). An increased number of the GMDP binding sites ( $5200 \pm 500$  per cell) was observed upon treating the melanoma BRO cells with tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). The mechanism of the TNF- $\alpha$  action most likely involves the unmasking of GMDP binding sites, initially expressed on the cell surface, by activating the endogenous protease that hydrolyzes surface proteins, in particular, highly glycosylated LAMP-2 protein exposed on the melanoma cell surface. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* GMDP receptors, LAMP-2 protein, melanoma, tumor necrosis factor  $\alpha$ , unmasking