



УДК 517.354

ДЕЙСТВИЕ В-СУБЪЕДИНИЦЫ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА НА КЛЕТКИ МЫШИНОЙ МАКРОФАГАЛЬНОЙ ЛИНИИ RAW 264.7

© 2019 г. Е. В. Наволоцкая*., #, В. Б. Садовников*, Д. В. Зинченко*, В. И. Владимиров*., **, Ю. А. Золотарев***, В. М. Липкин****, А. Н. Мурашев*

*Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 142290, Московская область, г. Пушкино, проспект Науки, 6

**Пуцинский государственный естественно-научный институт, Россия, 142290, Московская область, г. Пушкино, проспект Науки, 3

***Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики РАН, Россия, 123182, г. Москва, пл. акад. Курчатова, 2

****Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 20.06.2018 г.

После доработки 10.08.2018 г.

Принята к публикации 18.09.2018 г.

Установлено, что ^{125}I -меченная В-субъединица холерного токсина ($[^{125}\text{I}]\text{CT-B}$, удельная активность 98 Ки/ммоль) с высоким сродством связывается с клетками мышинной макрофагальной линии RAW 264.7 (K_d 2.3 нМ). Связывание $[^{125}\text{I}]\text{CT-B}$ ингибировали немеченные интерферон- α_2 (IFN- α_2), тимозин- α_1 (TM- α_1) и синтетический пептид LKEKK, соответствующий последовательностям 16–20 TM- α_1 и 131–135 IFN- α_2 человека (K_i 0.9, 1.1 и 1.4 нМ соответственно), но не ингибировал немеченный синтетический пептид с инвертированной последовательностью KKEKL ($K_i > 1$ мкМ). В диапазоне концентраций 10–1000 нМ CT-B и пептид LKEKK дозозависимо увеличивали продукцию клетками азота (NO), активность внутриклеточной растворимой гуанилатциклазы (sGC), а также способность клеток к адгезии, распластыванию и перевариванию бактерий вирулентного штамма *Salmonella typhimurium* 415 *in vitro*. Протестированный параллельно пептид KKEKL был неактивен. Таким образом, связывание CT-B и пептида LKEKK с рецептором на клетках линии RAW 264.7 приводит к увеличению их NO-синтазной, гуанилатциклазной и фагоцитарной активности.

Ключевые слова: пептиды, рецепторы, В-субъединица холерного токсина, клеточная линия RAW 264.7

DOI: 10.1134/S013234231902009X

ВВЕДЕНИЕ

Более двух десятилетий назад был синтезирован пептид LKEKKYSP – фрагмент 131–138 интерферона- α_2 (IFN- α_2) человека, способный с высоким сродством связываться с тимоцитами мыши и фибробластами человека [1, 2]. Связывание меченого пептида конкурентно ингибировали IFN- α_2 и тимозин- α_1 (TM- α_1). Сравнение аминокислотных последовательностей пептида и TM- α_1 показало, что они содержат одинаковый пятичленный фрагмент LKEKK, соответствующий

последовательностям 16–20 TM- α_1 и 131–135 IFN- α_2 . Ранее мы синтезировали пептид LKEKK, поместили его тритием и исследовали рецепцию меченого пептида. Проведенные эксперименты показали, что $[^3\text{H}]\text{LKEKK}$ с высоким сродством связывается с Т-лимфоцитами донорской крови [3] и мембранами тонкого кишечника крысы [4]. Связывание меченого пептида конкурентно ингибировали немеченые TM- α_1 , IFN- α_2 и В-субъединица холерного токсина (CT-B). Протестированный параллельно пептид с инвертированной последовательностью KKEKL не ингибировал связывание, что свидетельствовало о высокой специфичности рецептора. Обработка клеток протеазами не влияла на связывание, что указывало на небелковую природу рецептора или той его части, которая непосредственно участвует в связывании. На основании этих данных было сделано заключение, что пептид LKEKK, TM- α_1 ,

Сокращения: CT-B – В-субъединица холерного токсина; cGMP – циклический гуанозин-3',5'-монофосфат; IFN – интерферон; iNOS – индуцибельная NO-синтаза; LPS – липополисахарид; pGC – мембраносвязанная гуанилатциклаза; sGC – растворимая гуанилатциклаза; TM- α_1 – тимозин- α_1 .

Автор для связи: (тел.: +7 (4967) 73-66-68; факс: +7(4967)33-05-27; эл. почта: navolotskaya@bibch.ru).

IFN- α_2 и СТ-В имеют общий, по всей видимости, небелковый рецептор. Кроме того, было высказано предположение, что этим рецептором может быть рецептор холерного токсина GM1-ганглиозид [4].

Для проверки этого предположения мы получили ^{125}I -меченную СТ-В (^{125}I СТ-В) и изучили ее связывание с Т- и В-лимфоцитами донорской крови [5, 6], мембранами эпителиальных клеток тонкого кишечника крысы [7], эпителиальными клетками линий IEC-6 крысы и Сасо-2 человека [8]. Эксперименты показали, что во всех изученных случаях ^{125}I СТ-В с высоким сродством связывалась с небелковым рецептором и ее связывание ингибировали немеченые IFN- α_2 , ТМ- α_1 и пептид LKEKK, но не ингибировал пептид KKEKL. В диапазоне концентраций 10–1000 нМ СТ-В и пептид LKEKK дозозависимо увеличивали активность растворимой гуанилатциклазы (sGC), но не влияли на активность мембраносвязанной гуанилатциклазы (mGC) перечисленных типов клеток. Протестированный параллельно пептид KKEKL не влиял на активность sGC. Полученные результаты свидетельствовали о том, что связывание СТ-В и пептида LKEKK с общим рецептором на поверхности клетки-мишени приводит к увеличению активности sGC.

Цель настоящей работы – изучение действия СТ-В и пептида LKEKK на клетки мышинной макрофагальной линии RAW 264.7.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные характеристики пептидов (чистота, данные аминокислотного анализа, молекулярная масса) приведены в табл. 1. Удельная активность ^{125}I СТ-В составила 98 Ки/моль.

Эксперименты показали, что в выбранных нами условиях ^{125}I СТ-В специфически связывается с клетками линии RAW 264.7. Неспецифическое связывание меченого белка в этих условиях составляло $7.9 \pm 0.8\%$ от величины его общего связывания. На рис. 1 приведен график Скэтчарда, характеризующий специфическое связывание ^{125}I СТ-В с клетками RAW 264.7. Линейность графика свидетельствует о наличии на клетках одного типа рецепторов к СТ-В, а значение $K_d = 2.3 \pm 0.2$ нМ – о высоком сродстве белка к рецептору.

Для характеристики специфичности связывания ^{125}I СТ-В с клетками RAW 264.7, в качестве потенциальных конкурентов меченого белка были протестированы немеченые IFN- α_2 , ТМ- α_1 , пептиды LKEKK и KKEKL. Приведенные в табл. 2 значения K_i , равные 0.9 ± 0.2 , 1.1 ± 0.3 и 1.4 ± 0.3 нМ соответственно, свидетельствуют о высокой ингибирующей способности ТМ- α_1 , IFN- α_2 и пептида LKEKK и об отсутствии таковой у пептида с инвертированной последовательностью KKEKL – $K_i > 1$ мкМ. Неспособность пептида KKEKL ин-

гибировать связывание указывает на высокую специфичность рецептора.

Следует отметить, что СТ-В является перспективным иммуномодулирующим и противовоспалительным агентом. Недавние исследования показали, что белок подавляет иммунопатологические реакции при аллергии и аутоиммунных заболеваниях [9, 10], стимулирует гуморальный иммунитет и индуцирует противовоспалительные реакции *in vivo* [11, 12]. Поскольку пути передачи сигнала от СТ-В внутрь клетки, опосредующие эти эффекты, неизвестны, остается неясным, как один и тот же белок может обеспечивать два противоположных иммунных процесса – предотвращение инфекции и подавление аутоиммунных реакций.

Ранее мы показали, что связывание СТ-В и пептида LKEKK с Т- и В-лимфоцитами [6] и эпителиальными клетками слизистой оболочки тонкого кишечника [7, 8] приводит к увеличению активности растворимой гуанилатциклазы (sGC), но не влияет на активность аденилатциклазы и мембраносвязанной гуанилатциклазы (pGC). В настоящей работе мы изучили влияние СТ-В, пептидов LKEKK и KKEKL не только на активность sGC в клетках RAW 264.7, но и на продукцию ими активатора этого фермента – оксида азота (NO). Эксперименты показали, что в диапазоне концентраций 10–1000 нМ СТ-В и пептид LKEKK дозозависимо увеличивают продукцию клетками NO (табл. 3) и активность sGC в них, но не влияют на активность pGC (табл. 4). Протестированный параллельно пептид с инвертированной последовательностью KKEKL был неактивен, что свидетельствует о высокой специфичности действия СТ-В и пептида LKEKK. Таким образом, связывание СТ-В и пептида LKEKK с общим рецептором на поверхности клеток RAW 264.7 приводит к увеличению продукции NO и активации sGC.

NO – это диффузный мессенджер, опосредующий широкий спектр физиологических и патологических процессов в нервной, сердечнососудистой и иммунной системах [13]. Он выполняет несколько защитных функций: улучшает перфузию тканей, ингибирует агрегацию тромбоцитов [14], снижает адгезию лейкоцитов к эндотелиальным клеткам [15, 16] и пролиферацию клеток гладкой мускулатуры [17], способствует сохранению тканевой и органной архитектуры. Помимо регуляции нормальных физиологических функций NO участвует в развитии ряда патологических состояний, таких как септический шок, инсульт и нейродегенеративные заболевания [13, 18, 19]. NO синтезируется из L-аргинина изоформами NO-синтазы (NOS) – индуцибельной (iNOS), эндотелиальной (eNOS) и нейрональной (nNOS) [13, 20].

Показано, что растворимая гуанилатциклаза (sGC) – гетеродимер, состоящий из α - и β -субъединиц, катализирует превращение гуанозин-5'-

Таблица 1. Основные характеристики синтезированных пептидов

Пептид	Чистота, %	Данные аминокислотного анализа	Молекулярная масса, Да	
			эксп.	расчет.
LKEKK	>98	Glu 1.09 (1), Leu 1.00 (1), Lys 3.27 (3)	645.2	644.87
KKEKL	>95	Glu 1.12 (1), Leu 1.03 (1), Lys 3.32 (3)	648.6	644.87

трифосфата (GTP) в циклический гуанозин-3',5'-монофосфат (сGMP) и активируется прямым взаимодействием NO с гемом β -субъединицы [21]. Накапливающийся в клетке сGMP передает сигналы к нижестоящим элементам сигнального каскада: сGMP-зависимым протеинкиназам, сGMP-регулируемым катионным каналам и сGMP-активируемым фосфодиэстеразам [21, 22]. Имеются неопровержимые доказательства того, что эффекты низких концентраций NO (~5–50 мкМ) опосредованы сGMP [23, 24]. Полученные нами результаты согласуются с этими данными: возрастание продукции NO с 26 мкМ в контроле до 48 и 45 мкМ в присутствии, соответственно, 100 нМ СТ-В или пептида LKEKK (табл. 3) приводило к почти двукратному увеличению активности sGC (табл. 4).

Установлено, что NO увеличивает содержание F-актина в макрофагах и таким образом изменяет их способность к адгезии, образованию псевдоподий и фагоцитозу [25, 26]. Высказано предположение, что ключевыми регуляторами реорганизации актина, приводящей к морфологическим изменениям в NO-стимулированных клетках, может быть сGMP-регулируемый Ca^{2+} -кальмодулин [26].

Мы изучили влияние СТ-В и пептида LKEKK на адгезию, распластывание и фагоцитарную активность клеток RAW 264.7 *in vitro*. Известно, что наличие в организме воспаления приводит к усиленной направленной миграции лейкоцитов. Активированные клетки приобретают способность прилипать к сосудистому эндотелию и перемещаться в область инфекции и воспаления, при этом они изменяют свою округлую форму на звездчатую. Поэтому такие свойства фагоцитов как адгезия и распластывание адекватно отражают их функциональный статус. Кроме того, адгезию и распластывание клеток в какой-то мере можно рассматривать как начальные стадии фагоцитоза: прикрепление и обтекание частицы псевдоподиями [27]. Эксперименты показали, что СТ-В и пептид LKEKK при концентрации 100 нМ значительно увеличивают способность клеток RAW 264.7 к адгезии и распластыванию *in vitro*: количество прилипших к пластику клеток было соответственно на 29.4 и 22.6%, а распластанных на 39.7 и 33.2% больше, чем в контроле ($P < 0.05$).

Для изучения способности СТ-В и пептида LKEKK влиять на фагоцитарную активность клеток RAW 264.7 в качестве модельной системы был использован фагоцитоз бактерий вирулентного штамма *Salmonella typhimurium* 415 *in vitro*.

В табл. 5 приведены показатели (ФА, ЦПД и ФЧ – см. экспер. ч.), характеризующие фагоцитоз бактерий *S. typhimurium* 415 клетками RAW 264.7 в контроле и в присутствии СТ-В или пептида LKEKK. Результаты контрольных экспериментов показали, что клетки активно поглощают бактерии этого штамма: через 2 ч в фагоцитозе участвовало более половины общего числа клеток (ФА $56.3 \pm 5.2\%$); при этом каждый фагоцит содержал в среднем 7 микроорганизмов (ФЧ 7.0 ± 2.2). Однако переваривания поглощенных микробов не происходило. Более того, они продолжали активно размножаться внутри фагоцитов, о чем свидетельствует увеличение ФЧ с 7.0 ± 2.2 до 12.1 ± 3.2 между 2 и 7 ч фагоцитоза. Заражение клеток продолжалось 2 ч, затем среду заражения заменяли средой культивирования, и, начиная с этого момента, увеличение ФЧ могло происходить только за счет размножения ранее поглощенных микробов. Массовая гибель клеток наблюдалась уже к 7 ч фагоцитоза (ЦПД $61.7 \pm 5.3\%$), к 12 ч весь монослой был разрушен (ЦПД ~100%). Таким образом, в контроле взаимодействие микробов с клетками RAW 264.7 заканчивалось гибелью последних. В присутствии 100 нМ СТ-В или пептида LKEKK картина коренным образом менялась: в обоих случаях достоверно увеличивалась переваривающая способность клеток, размножения сальмонелл внутри клеток не наблюдалось (табл. 5). Полученные результаты свидетельствуют о способности СТ-В и пептида LKEKK стимулировать бактерицидную активность клеток RAW 264.7 *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

СТ-В, ТМ- α_1 , INF- α_2 и синтетический пептид LKEKK, соответствующий последовательностям 16–20 ТМ- α_1 и 131–135 IFN- α_2 , с высоким сред-

Таблица 2. Ингибирование немечеными лигандами специфического связывания ^{125}I -меченной СТ-В с клетками линии RAW 264.7

Лиганд	IC ₅₀	K _i
	нМ \pm SEM	
Интерферон- α_2	2.0 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2
Тимозин- α_1	2.6 \pm 0.3	1.1 \pm 0.3
LKEKK	3.2 \pm 0.3	1.4 \pm 0.3
KKEKL	>1000	>1000

Таблица 3. Влияние СТ-В, пептидов LKEKK и KKEKL на продукцию NO клетками RAW 264.7, активированными LPS

Концентрация лиганда, нМ	Продукция NO (нмоль NO ₂ ⁻ /мл культуральной среды ± SEM)		
	СТ-В	LKEKK	KKEKL
– (Контроль)	26 ± 3		
0.1	24 ± 2	22 ± 4	23 ± 4
1	28 ± 3	29 ± 4	25 ± 3
10	37 ± 4*	36 ± 3*	24 ± 2
100	48 ± 3*	45 ± 3*	29 ± 4
1000	46 ± 2*	47 ± 3*	27 ± 3

* Достоверное отличие от контроля ($P < 0.05$).

ством связываются с рецептором СТ-В на клетках RAW 264.7. Связывание СТ-В и пептида LKEKK с рецептором приводит к возрастанию продукции клетками NO, активации внутриклеточной sGC и увеличению фагоцитарной активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали тимозин- α_1 человека (ImmundiagnostikAG, Германия), фенолметилсульфонилфторид (PMSF), Tris (Fluka, США), среды для культивирования клеток, фетальную сыворотку теленка и Нерес (“ICN”, США); сахарозу, бычий сывороточный альбумин (BCA), EDTA, EGTA, азид натрия (NaN₃) (Serva, Германия), липополисахарид (LPS) из *Escherichia coli* серотип 055:B5 (“Sigma”, США), среду для культивирования клеток DMEM (Gibco, США); все остальные реагенты и растворители были отечественного производства и использовались после соответствующей очистки.

Пептиды LKEKK и KKEKL синтезировали на автоматических синтезаторах (модель 430A и

VegaCoupler, модель C250; Applied Biosystems, США) с использованием Вос/Bzl-тактики наращивания пептидной цепи и очищали препаративной обращенно-фазовой хроматографией (хроматограф “Gilson”, Франция), колонка WatersSymmetryPrepC18 (19 × 300 мм) (Malva, Греция). Синтезированные пептиды были охарактеризованы данными аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ (хроматограф “Gilson”, Франция; колонка XTerra RP18, Malva, Греция) и аминокислотного анализа (гидролиз 6 М HCl, 24 ч, 110°C; аминокислотный анализатор 4151 Alpha Plus, LKB, Швеция) и масс-спектрального анализа (масс-спектрометр “Finnigan”, США). Рекомбинантный интерферон- α_2 был получен из ФГУП “Гос. НИИ ОЧБ” ФМБА (Санкт-Петербург, Россия).

Введение ¹²⁵I в СТ-В (20 мкг) проводили по методу Саласински и соавт. [28] с помощью Na¹²⁵I (1 мКи) и Йодогена. Йодированный белок выделяли из реакционной смеси на колонке (0.9 × 10 см) с сефадексом G-25, элюируя 50 мМ фосфатным буфером (pH 7.4) со скоростью 5 мл/ч. Пик выхода ¹²⁵I-меченной СТ-В определяли в контрольном опыте с немеченой СТ-В. Радиоактивность фракций измеряли с помощью счетчика “Mini-Gamma Counter” (LKB, Швеция). Фракции с максимальной радиоактивностью, позиция которых соответствовала позиции пика немеченого белка в контроле, объединяли и определяли суммарную и удельную активности полученного препарата.

Макрофагальную клеточную линию мыши RAW 264.7 культивировали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональную сыворотку теленка, при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки (10⁶ клеток/лунка) высевали в 6-луночные планшеты для культивирования клеток (Nunc, Дания). Жизнеспособность клеток оценивали по окрашиванию витальным красителем трипановым синим (выживаемость клеток: 95%).

Реакцию связывания [¹²⁵I]СТ-В с клетками RAW 264.7 проводили в соответствии со следую-

Таблица 4. Влияние СТ-В, пептидов LKEKK и KKEKL на активность растворимой (sGC) и мембраносвязанной (pGC) гуанилатциклазы клеток RAW 264.7, активированных LPS

Концентрация лиганда, нМ	Гуанилатциклазная активность (нмоль cGMP/мг белка за 10 мин ± SEM)					
	sGC			pGC		
	СТ-В	LKEKK	KKEKL	СТ-В	LKEKK	KKEKL
– (Контроль)	1.5 ± 0.2			2.3 ± 0.2		
1	1.4 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.3	2.0 ± 0.2	2.5 ± 0.3	2.3 ± 0.3
10	2.0 ± 0.2*	1.9 ± 0.2*	1.2 ± 0.3	2.6 ± 0.3	2.2 ± 0.2	2.5 ± 0.2
50	2.5 ± 0.3*	2.3 ± 0.2*	1.6 ± 0.2	1.9 ± 0.3	2.3 ± 0.2	2.7 ± 0.3
100	2.9 ± 0.3*	2.8 ± 0.3*	1.4 ± 0.2	2.5 ± 0.3	2.1 ± 0.3	2.4 ± 0.2
1000	2.8 ± 0.2*	2.7 ± 0.2*	1.7 ± 0.3	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.3	1.8 ± 0.3

* Достоверное отличие от контроля ($P < 0.05$).

шей схемой: клеточную суспензию (10^6 клеток/мл) инкубировали с меченым белком (10^{-11} – 10^{-7} М, три параллельных пробы для каждой концентрации) в 1 мл среды DMEM, содержащей 10 мМ Hepes, 20 мМ NaN_3 и 50 мкМ PMSF, pH 7.4, при 4°C в течение 40 мин. По окончании инкубации реакционную смесь фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/A (Whatman, Англия). Фильтры промывали ледяным физиологическим раствором, содержащим 10 мМ Hepes, pH 7.4 (3 раза по 5 мл). Радиоактивность на фильтрах подсчитывали с помощью гамма-счетчика Mini-Gamma Counter. Величину специфического связывания [^{125}I]СТ-В с клетками определяли по разности между ее общим и неспецифическим связыванием, а величину неспецифического связывания [^{125}I]СТ-В – в присутствии 10^{-4} М немеченой СТ-В (1000-кратный избыток по отношению к самой большой концентрации меченого белка – 10^{-7} М). Для определения равновесной константы диссоциации K_d строили график зависимости отношения молярных концентраций связанной (B) и свободной (F) [^{125}I]СТ-В от молярной концентрации связанной [^{125}I]СТ-В (B) [29].

Для оценки способности ТМ- α_1 , IFN- α_2 , пептидов LKEKK и KKEKL ингибировать специфическое связывание [^{125}I]СТ-В с клетками RAW 264.7 суспензию клеток (10^6 клеток/мл) инкубировали с меченым белком (3 нМ) и одним из потенциальных конкурентов (диапазон концентраций 10^{-10} – 10^{-5} М, три повтора для каждой концентрации), как описано выше. Константу ингибирования (K_i) определяли по формуле: $K_i = [\text{IC}]_{50} / (1 + [\text{L}] / K_d)$ [30], где $[\text{L}]$ – молярная концентрация [^{125}I]СТ-В; K_d – равновесная константа диссоциации комплекса [^{125}I]СТ-В – рецептор; $[\text{IC}]_{50}$ – концентрация немеченого лиганда, вызывающая 50%-ное ингибирование специфического связывания меченого белка. Величину $[\text{IC}]_{50}$ определяли графически на основании кривой ингибирования. Значение K_d измеряли предварительно, как описано выше.

Для определения NO, продуцируемой клетками RAW 264.7, их предварительно инкубировали с LPS (1.0 мкг/мл) в течение 18 ч. В насыщенной кислородом среде NO быстро окисляется до NO_2^- , поэтому уровень NO оценивали по изменению содержания NO_2^- в среде культивирования. Образцы готовили согласно процедуре [31] и анализировали с использованием хемилюминесцентного метода [32]. Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью флуоресцентного спектрофотометра “Hitachi” (Япония) при длинах волн возбуждения и излучения 365 и 450 нм соответственно. Продукцию NO выражали в нмоль NO_2^- /мл среды. Для оценки достоверности разли-

Таблица 5. Влияние СТ-В и пептида LKEKK на фагоцитоз бактерий * вирулентного штамма *S. typhimurium* 415 LPS-активированными клетками RAW 264.7 *in vitro***

Белок/ пептид, нМ	ФА (%)	ЦПД (%)	ФЧ
– (Контроль)	46.2 ± 4.3	10.3 ± 2.0	3.2 ± 1.3
	56.3 ± 5.2	23.2 ± 3.2	7.0 ± 2.2
	49.2 ± 4.4	47.5 ± 4.1	10.2 ± 3.5
	36.2 ± 3.2	61.7 ± 5.3	12.1 ± 3.2
	0	~100	0
СТ-В (100)	75.3 ± 6.2 [♥]	3.2 ± 1.1 [♥]	5.2 ± 2.3
	87.5 ± 7.3 [♥]	7.6 ± 2.2 [♥]	6.3 ± 2.2
	64.0 ± 8.2 [♥]	13.2 ± 4.0 [♥]	5.0 ± 2.2 [♥]
	24.3 ± 5.4 [♥]	17.3 ± 4.2 [♥]	2.1 ± 1.3 [♥]
	7.2 ± 3.1	14.3 ± 2.3 [♥]	1.2 ± 0.3
LKEKK (100)	69.4 ± 5.2 [♥]	3.1 ± 2.2 [♥]	4.1 ± 2.2
	80.1 ± 6.3 [♥]	8.2 ± 3.0 [♥]	5.3 ± 2.1
	56.6 ± 3.4	16.3 ± 2.2 [♥]	4.3 ± 2.0 [♥]
	27.2 ± 5.5	18.2 ± 4.1 [♥]	3.2 ± 2.4 [♥]
	6.2 ± 3.2	19.4 ± 3.2 [♥]	1.3 ± 0.4

* ФА – фагоцитарная активность, ЦПД – цитопатическое действие бактерий, ФЧ – фагоцитарное число (см. экспер. часть).

** Строки для каждого соединения последовательно (сверху вниз) соответствуют данным, полученным через 1, 2, 4, 7 и 12 ч. [♥] – достоверное отличие от контроля ($P < 0.05$).

чий между средними значениями в контроле и опыте использовали *t*-критерий Стьюдента.

Для определения активности растворимой (sGC) и мембраносвязанной (pGC) гуанилатциклазы в RAW 264.7 клетках, активированных LPS (1.0 мкг/мл), их ресуспендировали в 10 мМ Tris-HCl-буферном растворе, pH 7.5, содержащем 1 мМ MgCl_2 , 1 мМ дитиотреитол, 5 мкМ пепстатин А, 50 мкМ PMSF, 10 мкМ ингибитор трипсина из сои и 1 мМ бензамидин. Полученную суспензию (2.5×10^8 клеток/мл) гомогенизировали в ледяной бане и гомогенат центрифугировали при 100000 *g* (10 мин, 4°C). Супернатанты отбирали, а осадки ресуспендировали в равных объемах буферного раствора. Супернатанты и ресуспендированные осадки использовали для определения активности sGC и pGC соответственно. Гуанилатциклазную активность определяли путем мониторинга превращения [α - ^{32}P] ГТР в [^{32}P] сGMP и выражали в количестве (нмоль) сGMP, образовавшегося за 10 мин в расчете на 1 мг белка [33]. Продукт выделяли осаждением с карбонатом цинка и хроматографией на колонке с окисью алюминия [34]. Концентрацию белка определяли с помощью метода Лоури, используя в качестве стандарта БСА [35]. Для оценки достоверности различий между средними значениями в контроле и опыте использовали *t*-критерий Стьюдента.

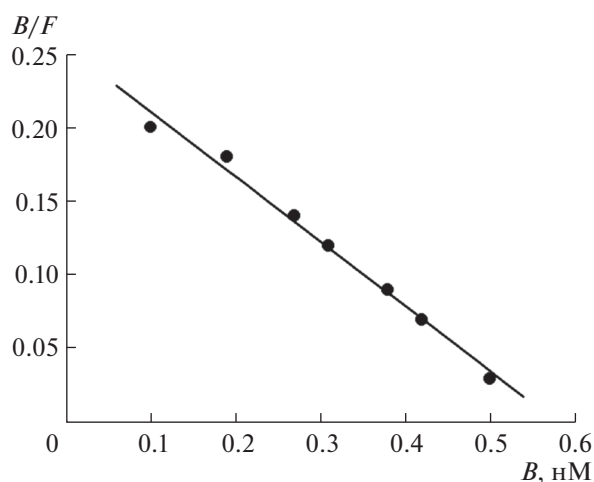


Рис. 1. Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания ^{125}I -меченной СТ-В с клетками линии RAW 264.7. B и F – молярные концентрации связанного и свободного меченого белка соответственно.

Для изучения адгезии и распластывания клеток RAW 264.7 их активировали LPS (1.0 мкг/мл) и культивировали в 96-луночном планшете в среде DMEM, содержащей 5% эмбриональную сыворотку теленка, в течение 12 ч в атмосфере 5% CO_2 при 37°C , затем фиксировали метанолом в течение 5 мин и окрашивали красителем Гимза. В камере Горяева подсчитывали число клеток, прилипших к 1 мм^2 поверхности. Для оценки распластывания использовали окулярную сетку: распластанными считали клетки, у которых продольные размеры превышали поперечные в 3 раза. В каждой лунке просчитывали по 300 клеток.

Для характеристики фагоцитарной активности клеток RAW 264.7, активированных LPS (1.0 мкг/мл), использовали разработанную нами ранее методику изучения фагоцитоза перитонеальными макрофагами мыши бактерией вирулентного штамма *S. typhimurium* 415 [36, 37]. Сальмонеллезную бактериальную культуру выращивали в бульоне Хоттингера при 37°C в течение 6 ч, пересеивали на мясопептонный агар и инкубировали при 37°C в течение 18 ч. Монослой клеток RAW 264.7 на покровных стеклах культивировали при 37°C в стерильных стеклянных пробирках со средой DMEM, содержащей стрептомицин и пенициллин (по 100 мкг/мл среды каждый) и инактивированную эмбриональную сыворотку теленка (5%). Спустя 1 сут клетки заражали средой, содержащей сыворотку и бактериальную культуру *S. typhimurium* 415 в таком количестве, чтобы ее конечное разведение составляло 10^8 микробных клеток на 1 мл среды. Через 2 ч контакт между клетками и микробами прерывали, заменяя среду заражения средой культивирования, содержащей антибиотики. В дальнейшем для предотвращения повторного захвата микробов, высвобождающих-

ся из разрушенных клеток, через каждый час среды культивирования заменяли свежей. Фиксирование клеток на покровных стеклах проводили через 1, 2, 4, 7 и 12 ч (метанол, 3 мин). Полученные препараты окрашивали 0.1% водным раствором красителя азур II–эозин в течение 5 мин. Под микроскопом при увеличении $\times 1350$ на каждом стекле просматривали по 300 клеток, определяя следующие показатели: фагоцитарную активность (ФА) – процент клеток, участвующих в фагоцитозе; цитопатическое действие бактерий (ЦПД) – процент клеток, разрушенных внутриклеточными бактериями; фагоцитарное число (ФЧ) – среднее количество микробов, приходящееся на одну клетку. Достоверность различий между контролем и опытом оценивали с помощью t -критерия Стьюдента.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” (грант № III-12, руководитель – член-корр. РАН В.М. Липкин).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zav'yalov V.P., Navolotskaya E.V., Abramov V.M., Galaktionov V.G., Isaev I.S., Kaurov O.A., Kozhich A.T., Maiorov V.A., Prusakov A.N., Vasilenko R.N., Volodina E.Yu.* // FEBS Lett. 1991. V. 278. P. 187–189.
2. *Zav'yalov V.P., Navolotskaya E.V., Vasilenko R.N., Abramov V.M., Volodina E.Y., Roslovvtseva O.A., Prusakov A.N., Kaurov O.A.* // Mol. Immunol. 1995. V. 32. P. 425–431.
3. *Наволоцкая Е.В., Зинченко Д.В., Золотарев Ю.А., Колобов А.А., Липкин В.М.* // Биохимия. 2016. Т. 81. С. 1109–1114. [*Navolotskaya E.V., Zinchenko D.V., Zolotarev Y.A., Kolobov A.A., Lipkin V.M.* // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. P. 871–875.]
4. *Наволоцкая Е.В., Садовников В.Б., Зинченко Д.В., Владимиров В.И., Золотарев Ю.А., Колобов А.А.* // Биоорг. химия. 2016. Т. 42. С. 533–538. [*Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Vladimirov V.I., Zolotarev Y.A., Kolobov A.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2016. V. 42. P. 479–483.]
5. *Наволоцкая Е.В., Садовников В.Б., Зинченко Д.В., Золотарев Ю.А., Липкин В.М., Завьялов В.П.* // Биохимия. 2017. Т. 82. С. 1330–1337. [*Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Zolotarev Y.A., Lipkin V.M., Zav'yalov V.P.* // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. P. 1036–1041.]
6. *Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Lipkin V.M., Zav'yalov V.P.* // Int. Immunopharmacol. 2017. V. 50. P. 279–282.
7. *Наволоцкая Е.В., Садовников В.Б., Зинченко Д.В., Владимиров В.И., Золотарев Ю.А.* // Биоорг. химия. 2017. Т. 43. С. 655–660. [*Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Vladimirov V.I., Zolotarev Y.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2017. V. 43. P. 673–677.]
8. *Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Lipkin V.M., Zav'yalov V.P.* // Toxicology in Vitro. 2018. V. 47. P. 269–273.
9. *Smits H.H., Gloudemans A.K., van Nimwegen M., Wil-lart M.A., Soullie T., Muskens F., de Jong E.C., Boon L.,*

- Pilette C., Johansen F.E.* // *Mucosal. Immunol.* 2009. V. 2. P. 331–339.
10. *Sun J.B., Czerkinsky C., Holmgren J.* // *Scand. J. Immunol.* 2010. V. 71. P. 1–11.
 11. *Baldauf K.J., Royal J.M., Hamorsky K.T., Matoba N.* // *Toxins.* 2015. V. 7. P. 974–996.
 12. *Stratmann T.* // *Vaccines (Basel).* 2015. V. 3. P. 579–596.
 13. *Bredt D.S., Snyder S.H.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1994. V. 63. P. 175–195.
 14. *Tsiklas D., Ikic M., Tewes K.S., Raida M., Frolich J.C.* // *FEBS Lett.* 1999. V. 442. P. 162–166.
 15. *Gidday M., Park T.S., Shah A.R., Gonzales E.R.* // *Stroke.* 1998. V. 29. P. 1423–1430.
 16. *Polte T., Schroder H.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 251. P. 460–465.
 17. *Hassid A., Yao J., Huang S.* // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 277. P. H1014–H1026.
 18. *Bolaños J.P., Almeida A.* // *Biochim. et Biophys. Acta.* 1999. V. 1411. P. 415–436.
 19. *Titheradge M.A.* // *Biochim. et Biophys. Acta.* 1999. V. 1411. P. 437–455.
 20. *Stuehr D.J.* // *Biochim. et Biophys. Acta.* 1999. V. 1411. P. 217–230.
 21. *Kots A., Y., Martin E., Sharina I.G., Murad F.* // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2009. V. 191. P. 1–14.
 22. *Denninger J.W., Marletta M.A.* // *Biochim. et Biophys. Acta.* 1999. V. 1411. P. 334–350.
 23. *Niedbala W., Wei X.Q., Piedrafita D., Xu D., Liew F.Y.* // *Eur. J. Immunol.* 1999. V. 29. P. 2498–2505.
 24. *Niedbala W., Cai B., Liew F.Y.* // *Ann. Rheumatic Dis.* 2006. V. 65. P. 37–40.
 25. *Jun C.-D., Han M.-K., Kim U.-H., Chung H.-T.* // *Cell. Immunol.* 1996. V. 174. P. 25–35.
 26. *Ke X., Terashima M., Nariai Y., Nakashima Y., Nabika T., Tanigawa Y.* // *Biochim. et Biophys. Acta.* 2001. V. 1539. P. 101–113.
 27. *Фрейдлин И.С.* Система мононуклеарных фагоцитов. М.: Медицина, 1984.
 28. *Salacinski P.R., McLean C., Sykes J.E., Clement-Jones V.V., Lowry P.J.* // *Anal. Biochem.* 1981. V. 117. P. 136–146.
 29. *Pennock B.E.* // *Anal. Biochem.* 1973. V. 56. P. 306–309.
 30. *Cheng Y.C., Prusoff W.* // *Biochem. Pharmacol.* 1973. V. 22. P. 3099–3108.
 31. *Ke X., Terashima M., Nariai Y., Nakashima Y., Nabika T., Tanigawa Y.* // *Biochim. et Biophys. Acta.* 2001. V. 1539. P. 101–113.
 32. *Misko T.P., Schilling R.J., Salvemini D., Moore W.M., Currie M.G.* // *Anal. Biochem.* 1993. V. 214. P. 11–16.
 33. *Schultz G., Böhme E.* *Methods of Enzymatic Analysis*, Weinheim, Germany: Verlag Chemie, 1984. P. 379–389.
 34. *Southam E.* // *Curr. Protoc. Toxicol.* 2001. V. 10. P. 10.5.
 35. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr O.L., Randal R.J.* // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
 36. *Наволоцкая Е.В., Колобов А.А., Кампе-Немм Е.А., Заргарова Т.А., Малкова Н.В., Краснова С.Б., Ковалюцкая Ю.А., Завьялов В.П., Липкин В.М.* // *Биохимия.* 2003. Т. 68. С. 42–51. [*Navolotskaya E.V., Kolobov A.A., Kampe-Nemm E.A., Zargarova T.A., Malkova N.V., Krasnova S.B., Kovalitskaya Yu.A., Zav'yalov V.P., Lipkin V.M.* // *Biochemistry (Moscow).* 2003. V. 68. P. 34–41.]
 37. *Navolotskaya E.V., Zargarova T.A., Malkova N.V., Zharmukhamedova T.Y., Kolobov A.A., Kampe-Nemm E.A., Yurovsky V.V., Lipkin V.M.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 303. P. 1065–1072.

Action of Cholera Toxin B Subunit on Murine Macrophage-Like Cell Line Raw 264.7

E. V. Navolotskaya*, #, V. B. Sadovnikov*, D. V. Zinchenko*, V. I. Vladimirov*, **, Y. A. Zolotarev***, V. M. Lipkin****, and A. N. Murashev*

#Phone: +7 (4967) 73-66-68; e-mail: navolotskaya@bibch.ru

*Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Science, Science Avenue, 6, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

**Pushchino State Natural Science Institute, Science Avenue, 3, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

***Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Science, Kurchatov square, 2, Moscow, 123182 Russia

****Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Miklukho-Maklaya street, 16/10, Moscow, GSP-7, 117997 Russia

It is established that ¹²⁵I-labeled cholera toxin B-subunit (¹²⁵I-labeled CT-B, specific activity of 98 Ci/mmol) binds with high affinity to cells of macrophage-like cell line RAW 264.7 (K_d 2.3 nM). The binding of ¹²⁵I-labeled CT-B was inhibited by unlabeled interferon- α_2 (IFN- α_2), thymosin- α_1 (TM- α_1), and synthetic peptide LKEKK corresponding to sequences 16–20 of human TM- α_1 and 131–135 of IFN- α_2 (K_i 0.9, 1.1 and 1.4 nM, respectively) but did not inhibit unlabeled synthetic peptide with inverted KKEKL sequence ($K_i > 1 \mu\text{M}$). In the 10–1000 nM concentration range, CT-B and peptide LKEKK dose-dependently increased the nitric oxide (NO) production, the activity of soluble guanylate cyclase (sGC), as well as the adhesion, spreading, and capacity to digest bacteria of *Salmonella typhimurium* virulent strain 415 *in vitro* by the cells. The peptide KKEKL tested in parallel was inactive. Thus, the CT-B and peptide LKEKK binding to the receptor on RAW 264.7 cells leads to an increase in NO-synthase, guanylate cyclase and phagocytic activity.

Keywords: peptides, receptors, thymosin- α_1 , interferon- α , RAW 264.7 cell line