

## Особенности влияния мелиттина и его триптолитического фрагмента на активность протеинкиназы С

П. В. Погребной\*, Л. В. Гарманчук, Н. В. Маркеева,  
А. Ф. Протас<sup>1</sup>, А. И. Быкорез

Институт эксперим. патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины  
252022 Киев, ул. Васильковская, 45

<sup>1</sup>Украинский научный центр радиационной медицины АМН Украины  
254050 Киев, ул. Мельникова, 53

*Мелиттин в концентрации 5 и 0,5 мкМ ингибирует активность протеинкиназы С (ПКС), предварительно активированной форболовыми эфирами, в клетках линии Jurkat (человеческая Т-лимфобластная лейкемия). При использовании метода триптолитического расщепления получен фрагмент мелиттина 7—19 и исследовано его действие на активность ПКС. Фрагмент мелиттина, как и цельный мелиттин, подавляет активность ПКС. В то же время указанный фрагмент обладает значительно меньшей цитолитической активностью, чем цельный мелиттин, что позволяет считать его более эффективным ингибитором ПКС.*

**Введение.** Протеинкиназа С (ПКС) принадлежит к семейству серин/треониновых киназ, играющих критическую роль в регуляции дифференцировки и пролиферации многих типов клеток в ответ на различные стимулы, включая гормоны, нейротрансмиттеры, ростовые факторы, а также вирусную инфекцию [1—3]. Участие ПКС в регуляции клеточных процессов обусловлено двумя основными факторами — образованием внутриклеточных мессенджеров, активирующих ПКС, и наличием соответствующих субстратов фосфорилирования.

В норме активность ПКС широко варьирует при различных физиологических условиях и фазах клеточного цикла и может подвергаться быстрой и обратной стимуляции под воздействием специфических модуляторов.

О роли ПКС в процессах малигнизации клеток судят по влиянию на них форболовых эфиров, для которых ПКС является основной мишенью и специфическим рецептором. В зависимости от типа клеток действие форболовых эфиров вызывает различные эффекты, включая индукцию или торможение дифференцировки, модуляцию активности некоторых мембранных белков, промоцию канцерогенеза кожи [3, 4]. В случае ВИЧ-инфекции активированная ПКС, по-видимому, обеспечивает некоторые этапы в проявлении и развитии болезни [2, 5, 6]. При ВИЧ-инфекции главной мишенью для вируса служит популяция созревших в тимусе Т-лимфоцитов, одним из ранних проявлений в ответ на антигенную активацию которых

\*Correspondence address.

является фосфорилирование по серин/треониновым остаткам функционально значимых белков клетки [2]. Эти клетки несут на своей поверхности молекулы гликопротеина, называемого *CD4* и связывающего гликопротеин вируса. При ВИЧ-инфекции основным агентом, активирующим ПКС, является поверхностный белок вируса *gp 120*. В связи с этим особую актуальность приобретают поиски специфических ингибиторов ПКС, а также исследование конкретных механизмов ее активации и ингибирования для получения препаратов, способных подавлять или затормаживать развитие ВИЧ-инфекции на различных этапах. Одним из возможных перспективных ингибиторов ПКС может выступать мелиттин [7] — амфипатический пептид, состоящий из 26 аминокислотных остатков и являющийся основным компонентом пчелиного яда. Поскольку мелиттин — токсичный пептид, способный спонтанно встраиваться в природные и синтетические мембраны и в микромолярных концентрациях разрушать клетки [8—11], то целью данного исследования было изучение действия мелиттина и его триптолитических фрагментов на активность ПКС и пролиферативный ответ клеток. Поиск проникаемых для клеток селективных агентов, влияющих на активность ПКС, является актуальной задачей при решении проблемы аллергических, онкологических заболеваний и СПИДа.

**Материалы и методы.** Эксперименты проведены на клетках линии Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия человека), которые культивировали в среде DMEM с 10 % эмбриональной сыворотки теленка («Seromed» и «Биос») при 37 °С в атмосфере 5 %-го CO<sub>2</sub> и 90 %-й влажности.

Мелиттин из яда пчел выделяли обратнофазной хроматографией на колонке Per RPC 5/5 HR («Pharmacia», Швеция) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0—80 % в течение 20 мин) в присутствии 0,035 % трифторуксусной кислоты в HPLC-системе фирмы ISCO (США).

Активность фосфолипазы А2 в препаратах мелиттина определяли по известной методике [9].

Для получения фрагментов мелиттина применяли метод расщепления белковых молекул трипсином («Sigma», США). Реакцию проводили в 0,2 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (рН 8,8) при 37 °С на протяжении 4 ч. Фермент-субстратное соотношение составляло 1:50. Реакцию останавливали внесением 1 М уксусной кислоты в инкубационную смесь до рН 2,0. Далее реакционную смесь лиофилизировали. В качестве контроля использовали мелиттин, который инкубировали в тех же условиях, но без трипсина.

Цитолитическую активность мелиттина и его фрагментов оценивали на 2,5 % суспензии эритроцитов человека в 0,15 М NaCl, 50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (рН 4,5). Кинетику гемолиза регистрировали при длине волны 630 нм на спектрофотометре DU-65 («Beckman», США).

ПКС из мозга свиньи частично очищали при помощи ионообменной хроматографии [12], используя DEAE-Toyopearl 650 М («Toyo-Soda», Япония). Для этого мозг гомогенизировали в буфере, содержащем 10 мМ HCl (рН 7,5), 10 мМ EGTA, 5 мМ EDTA, 0,1 % меркаптоэтанола, 0,1 % апротенина, 4 мкг/мл лейпептина и 4 мкг/мл трипсинового ингибитора. После этого центрифугировали при 10 000 г. Супернатант наносили на предварительно уравновешенную этим же буфером колонку. Элюцию проводили в градиенте концентраций (25—300 мМ) NaCl. Фосфорилирование ПКС из мозга свиньи осуществляли в буфере, содержащем 137 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,3 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 мМ β-глицерофосфат, 5 мМ EGTA, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10 мМ γ-<sup>32</sup>P-АТФ, 20 мМ HEPES (рН 7,2). В качестве субстрата для ПКС при тестировании фракций использовали гистон H1 («Sigma», США).

Активность ПКС в лимфоцитах определяли, используя данные работ [13, 14]. После остановки киназной реакции с помощью радиоавтографии

регистрировали уровень аутофосфорилирования ПКС и фосфорилирования белка *p47* — одного из субстратов фосфорилирования ПКС [15]. Диск-электрофорез в присутствии DS-Na проводили в системе буферов по Леммли [16], используя 5—22 %-й градиент концентрации полиакриламидного геля. После окрашивания гели высушивали под вакуумом, экспонировали в течение 3—5 сут при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  с рентгеновской пленкой ORWO HS-11.

Для выявления пролиферации клеток их метили  $^3\text{H}$ -тимидином [17]:  $5 \cdot 10^5$  клеток в 1 мл инкубировали в среде ДМЕМ, содержащей форболовые эфиры (1 нМ), в течение 6 ч, затем добавляли тимидин в концентрации 1 мкКи/мл (удельная активность 10 Ки/ммоль) и инкубировали их еще 6 ч.

**Результаты и обсуждение.** Анализ хроматограммы, представленной на рис. 1, *a*, свидетельствует о том, что нами получен мелиттин  $97 \pm 2\%$  чистоты. Применение колонки Per RPC 5/5 HR позволяет в один прием выделить до 5 мг практически чистого мелиттина. В очищенном препарате мелиттина не обнаружено примесей фосфолипазы А2.

Для получения фрагментов мелиттина мы использовали трипсинолиз. Предварительно было показано, что цельный мелиттин не обладает аутолитической активностью. После трипсинового расщепления фрагменты мелиттина разделяли с помощью HPLC на колонке Per RPC 5/5 HR в линейном

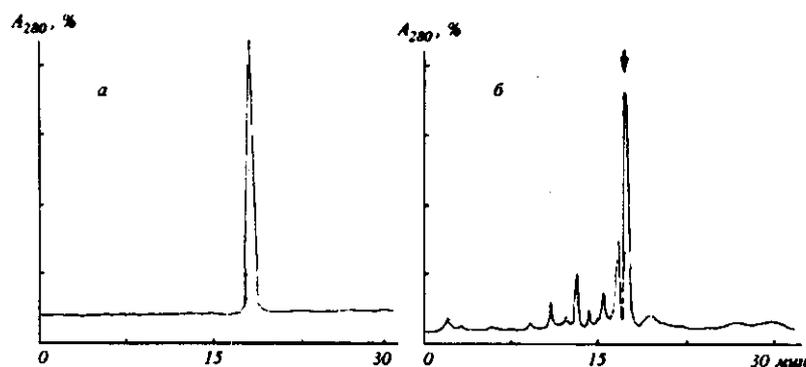


Рис. 1. HPLC-хроматография intactного мелиттина (*a*) и после обработки трипсином (*b*). Стрелкой указан основной триптолитический фрагмент, использованный в работе

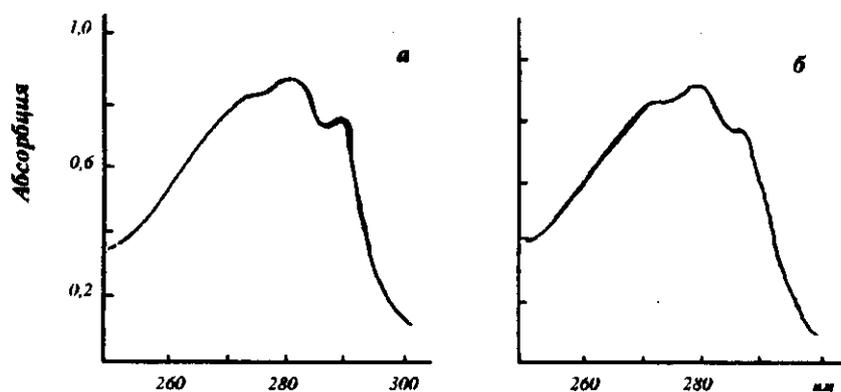


Рис. 2. Спектры оптического поглощения мелиттина (*a*) и его основного фрагмента, полученного после хроматографии (*b*)

градиенте концентрации (0—80 %) ацетонитрила. Хроматограммы продуктов трипсинолиза детектировали при 210 и 280 нм. Результаты хроматографии, представленные на рис. 1, б, свидетельствуют о полном трипсинолизе мелиттина. Этот вывод основан на специфичности трипсина, высокой гидрофобности, а также спектрофотометрических характеристиках материала пика, указанного стрелкой на рис. 1, б. Спектры поглощения мелиттина и полученного пептида приведены на рис. 2. Мы полагаем, что материал данного пика являет собой фрагмент мелиттина 7—19. Поскольку связь Lys — Val может расщепляться трипсином с неполным выходом, мы не можем исключить некоторой примеси фрагмента 1—19. В дальнейшей работе использовали триптолитический фрагмент мелиттина 7—19 ( $M_{7-19}$ ). Сравнительный анализ гемолитической активности мелиттина и его фрагмента  $M_{7-19}$  показал (рис. 3), что последний в концентрации  $5 \cdot 10^{-6}$  М за 5 мин лизирует  $15 \pm 5$  % эритроцитов человека, в то время как нативный мелиттин приводит к лизису  $88 \pm 7$  % клеток.

Исходя из способности мелиттина блокировать АТФ-связывающий домен ПКС [7], мы исследовали влияние его триптолитического фрагмента на киназную активность фермента. К очищенной из мозга свиньи и активированной форболовыми эфирами ПКС добавляли мелиттин или его фрагмент  $M_{7-19}$  в различных концентрациях, а затем проводили реакцию фосфорилирования. Результаты радиоавтографии свидетельствуют, что мелиттин в концентрации  $5 \cdot 10^{-6}$  —  $5 \cdot 10^{-7}$  М подавляет фосфорилирование активированной ПКС. Аналогичные данные получены и при действии  $M_{7-19}$  (рис. 4, а). Результаты воздействия фрагмента мелиттина 7—19 на фосфокиназную активность ПКС клеток линии Jurkat представлены на рис. 4, б. Активность фосфорилирования ПКС на клетках регистрировали в стандартном буфере в присутствии 0,01 %-го дигитонина. Как видно из рис. 4, б, фрагмент  $M_{7-19}$  в концентрации  $5 \cdot 10^{-7}$  М также заметно подавляет киназную активность ПКС клеток.

При исследовании действия мелиттина и его фрагмента на пролиферацию клеток линии Jurkat установлено, что мелиттин в концентрации  $10^{-6}$  М приводит к изменению включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК активированных

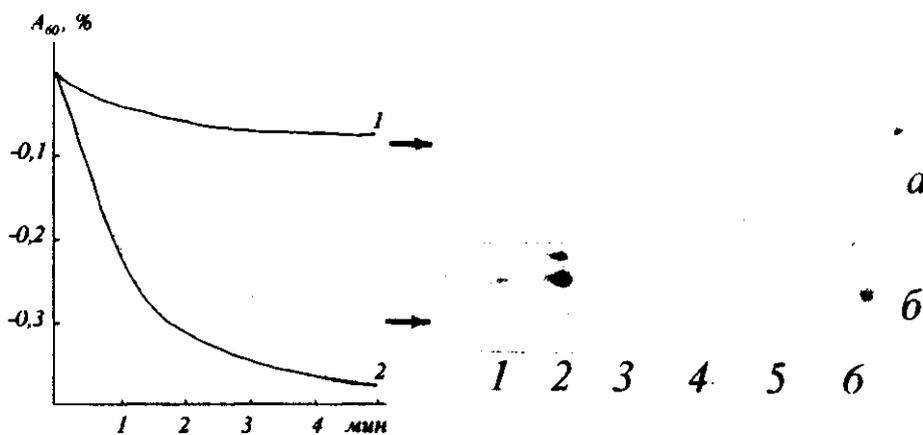


Рис. 3. Кривые гемолиза эритроцитов под действием мелиттина (1) и его основного триптолитического фрагмента (2)

Рис. 4. Радиоавтографы фосфорилирования протеинкиназы С из мозга свиньи (а) и клеток Jurkat (б) при действии интактного мелиттина и его фрагмента. Фосфокиназную активность ПКС определяли в присутствии форболовых эфиров (2—б). Треки 3, 4 — фосфорилирование с добавлением мелиттина в концентрациях 5 и 0,5 мкМ соответственно; треки 5, 6 — с добавлением фрагмента мелиттина 7—19 в концентрациях 5 и 0,5 мкМ

*Действие мелиттина и его фрагмента 7—19 на пролиферацию клеток Jurkat*

Концентрация препарата, мкМ	Включение <sup>3</sup> H-тимидина в ДНК клеток	
	имп/мин	% от контроля
Контроль*	11500	100
Цельный мелиттин		
10	5000	43,5
5	7500	65,2
2,5	9900	86,1
1	19500	169,6
0,1	15800	137,4
0,01	11700	101,7
Фрагмент 7—19		
10	6350	55,2
5	9100	78,8
2,5	11100	96,5
1	17800	155,1
0,1	15200	132,2
0,01	11800	104,2

Примечание. Представлен типичный результат одного из трех опытов; каждое значение — среднее трех параллельных проб (разброс проб  $\pm 350$  имп/мин); \*достоверной разницы включения <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК клеток в присутствии или отсутствие форболовых эфиров нами не зарегистрировано.

форболовыми эфирами Т-лимфоцитов по сравнению с контрольными (таблица). Из данных, представленных в таблице, видно, что мелиттин и его фрагмент 7—19 в концентрациях  $10^{-6}$  —  $10^{-7}$  М усиливают пролиферативный ответ Т-лимфоцитов.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что очищенный после обработки трипсином фрагмент  $M_{7-19}$  способен ингибировать ПКС, активированную форболовыми эфирами, в тех же концентрациях, что и нативный мелиттин. Следует отметить, что указанный фрагмент обладает менее выраженным цитотоксическим действием, чем нативный мелиттин. Исходя из этого можно заключить, что триптолитический фрагмент  $M_{7-19}$  может использоваться как более эффективный ингибитор ПКС по сравнению с нативным мелиттином, поскольку при действии на киназную активность клетки он вызывает меньше побочных эффектов.

Изложенные данные позволяют надеяться на более глубокое и всестороннее подтверждение полученных нами результатов при последующих биохимических и иммунологических исследованиях.

Работа частично финансировалась Национальным комитетом по борьбе с заболеванием на СПИД при Президенте Украины (проект 93/26).

*П. В. Погребной, Л. В. Гарманчук, Н. В. Маркеева, О. Ф. Протас, А. Я. Бикориз*

Особливості впливу меліттину і його триптолітичного фрагмента на активність протеїнкінази С

## Резюме

*Меліттин у концентрації 5 і 0,5 мкМ пригнічує активність протеїнкінази С (ПКС), попередньо активованої форболовими ефірами, у клітинах лінії Jurkat (Т-лімфобластна лейкемія людини). При використанні методу триптолітичного розщеплення одержано фрагмент меліттину 7—19 і*

досліджено його дію на активність ПКС. Фрагмент мелітину, як і цілісний мелітин, пригнічує активність ПКС. У той же час згаданому фрагменту притаманна значно менша цитолітична активність порівняно з цілісним мелітином, що свідчить про його вищі інгібіторні властивості щодо ПКС.

P. V. Pogrebnoy, L. V. Garmanchouk, N. V. Markeeva, A. Ph. Protas, A. J. Bykorez

Peculiarity of influence of melittin and it's triptolytic fragment on activation of protein kinase C

#### Summary

The inhibition of protein kinase C activity in TPA stimulated Jurkat cells (human T-lymphoblast leukemia) was detected while addition of  $5 \cdot 10^{-6}$ — $5 \cdot 10^{-7}$  M of melittin. The method of trypsinolysis was used to obtain of melittin fragment  $M_{7-19}$  that was also used as inhibitors of activated protein kinase C in T-lymphocytes. Fragment  $M_{7-19}$  inhibited PKC at the same level as native melittin. At the same time  $M_{7-19}$  fragment caused the less level of erythrocytes lysis, so it may be used as more effective inhibitor of PKC.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Fields P. A., Bednarc D. P., Hess A., May W. S. Human immunodeficiency virus induces phosphorylation of its cell surface receptor // *Nature*.—1988.—333.—P. 278—280.
2. Jakobovits A., Rosenthal A., Capon D. J. Trans-activation of HIV-1 LTR-directed gene expression by that requires protein kinase C // *EMBO J.*—1990.—9.—P. 1165—1170.
3. Blumberg P. Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: Sixth rhoads memorial award lecture // *Cancer Res.*—1988.—48.—P. 1—8.
4. Hoxie J. A., Rackowski J. L., Haggerty B. S., Gaulton G. H. T4 endocytosis and phosphorylation induced by phorbol esters but not by mitogen or HIV infection // *J. Immunol.*—1988.—137.—P. 1194.
5. Cefay D., Ferrer M., Serpente N. et al. Internalization of HIV glycoprotein gp 120 is associated with down-modulation of membrane CD4 and p56 (lck) together with impairment of T-cell activation // *Ibid.*—1992.—149, N 1.—P. 285—294.
6. Robertson M. J., Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells // *Blood*.—1990.—76, N 12.—P. 2421—2431.
7. Obrian C. A., Ward N. E. ATP-sensitive binding of melittin to the catalytic domain of protein kinase C // *Mol. Pharmacol.*—1989.—36, N 3.—P. 355—359.
8. Демченко А. П., Костржевская Е. Г. Мелітин: структура, свойства, взаємодія з мембраною // *Укр. біохім. журн.*—1986.—58.—С. 92—102.
9. Wille B. A preparation of melittin depleted of phospholipase A by ion exchange chromatography in denaturing solvents // *Anal. Biochem.*—1989.—178, N 1.—P. 118—120.
10. Maulet G., Brodbeck U., Fulpius B. W. Purification from bee venom of melittin devoid of phospholipase A contamination // *Ibid.*—1982.—127, N 1.—P. 61—68.
11. Depsey C., Butler G. S. Helical structure and orientation of melittin in dispersed phospholipid membranes from amide exchange analysis *in situ* // *Biochemistry*.—1992.—31, N 48.—P. 11973—11977.
12. Woodgett J. R., Hunter T. Isolation and characterization of two distinct forms of protein kinase C // *J. Biol. Chem.*—1987.—262, N 10.—P. 4836—4843.
13. Taffet S. M., Greenfield A. R. L., Haddox M. K. Retinal inhibits TPA activated, calcium-dependent, phospholipid-dependent protein kinase C // *J. Biochem and Biophys. Res. Commun.*—1983.—114.—P. 1194—1199.
14. Tsygankov A. Y., Spana C., Rowley R. B. et al. Activation-dependent tyrosine phosphorylation of Fyn-associated proteins in T lymphocytes // *J. Biol. Chem.*—1994.—269.—P. 7792—7800.
15. Nixon J. S., Bishop J., Bradshaw D. et al. The design and biological properties of potent and selective inhibitors of protein kinase C // *Biochem. Soc. Transactions*.—1992.—P. 419—425.
16. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 // *Nature*.—1970.—227.—P. 680—685.
17. Клаус Дж. Лимфоциты. Методы.—М.: Мир, 1990.—395 с.