

# Експресія нікотинових ацетилхолінових рецепторів на клітинах В-лімфом людини

Д. М. Омельченко, М. В. Скок

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України  
Вул. Леонтовича, 9, Київ, Україна, 01601

skok@biochem.kiev.ua

---

**Мета.** Визначити зв'язок між рівнем експресії нікотинових ацетилхолінових рецепторів (НАХР) і ступенем диференціації та активації В-лімфоцитів. **Методи.** Експресію НАХР на клітинних лініях REH, Ramos і Daudi вивчали методом протокової цитофлуориметрії з використанням антитіл, специфічних до різних субодиноць рецептора; проліферацію клітин оцінювали за допомогою МТТ-тесту. **Результати.** Показано, що рівень експресії 4/2/4 та 7 НАХР підвищується по мірі диференціації (Ramos > REH) і активації В-лімфоцитів (Daudi > Ramos) та залежить від експресії антиген-специфічного рецептора. Стимуляція/блокування НАХР не впливає на інтенсивність проліферації досліджених клітин.

**Ключові слова:** нікотиновий ацетилхоліновий рецептор, В-лімфоцити.

---

**Вступ.** Нікотинові ацетилхолінові рецептори (НАХР) опосередковують швидку синаптичну передачу в м'язах і автономних гангліях та регулюють когнітивні процеси в мозку [1]. Важливу роль холінергічної регуляції у процесах клітинної проліферації, активації та імунної відповіді встановлено після виявлення НАХР у кератиноцитах шкіри, епітелії дихальних шляхів, ендотелії судин [2, 3], лімфоцитах і макрофагах [4, 5].

Раніше ми показали, що В-лімфоцити мишей експресують два субтипи НАХР, 4(5)2 і 7, які впливають на селекцію/виживання В-лімфоцитів у процесі розвитку та їхню активацію у зрілому стані і, як наслідок, на гуморальну імунну відповідь [6, 7]. 7-вмісні НАХР, експресовані в клітинах гібридоми, регулюють їхню проліферацію та продукування антитіл [8]. Однак, чи поширюються знай-

дені ефекти на лімфоцити людини, залишається невідомим. Такі дослідження є важливими для розуміння впливу нікотину на розвиток пухлин В-лімфоцитарного походження.

Мета представленої роботи полягала у вивченні експресії та про-проліферативних функцій НАХР на клітинах В-лімфом людини.

**Матеріали і методи.** Клітинні лінії REH, Ramos і Daudi отримано від С. П. Сидоренко (Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України). Клітини вирощували в середовищі RPMI 1640 з додаванням 20 мМ HEPES, 40 мкг/мл гентаміцину та 10 % ембріональної сироватки теляти («Sigma», США). Кролячі афінно очищені антитіла проти субодиноць НАХР одержано раніше [9, 10]. Антитіла проти CD19, мічені флуоресцеїнізотіоціанатом (ФІТЦ), та антитіла проти CD22, мічені фікоеритрином (ФЕ), вироблено фірмою «Immunotech» (Франція),

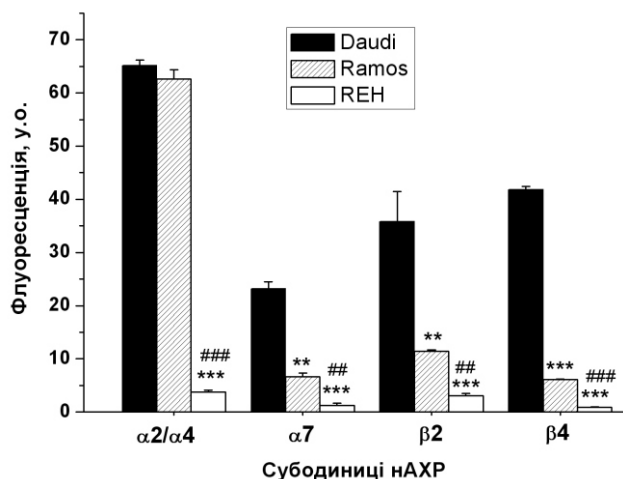


Рис. 1. Зв'язування nAChP-специфічних антитіл з клітинами Daudi (1), Ramos (2) та REH (3) у протоковій цитофлуориметрії; \* $p < 0,005$ ; \*\* $p < 0,0005$  порівняно з клітинами Daudi; # $p < 0,005$ ; ## $p < 0,0005$  порівняно з клітинами Ramos; ### $p < 0,0005$  порівняно з клітинами REH.

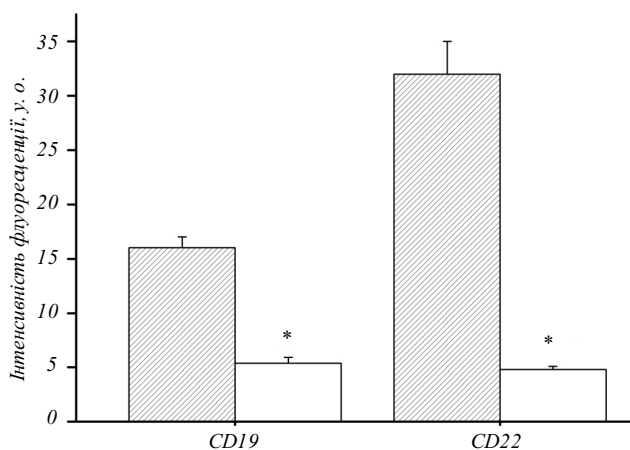


Рис. 2. Зв'язування CD19 та CD20 антитіл з клітинами Ramos (1) і REH (2) у протоковій цитофлуориметрії; \* $p < 0,0005$ .

стрептавідин, мічений ФЕ, – «Pharmingen» (BD), епібатидин та метиллікаконітин (МЛІА) – «Sigma» (США).

Клітини ( $1 \cdot 10^6$  у 50 мкл забуференого фізіологічного розчину з 1 %-м сироватковим альбуміном бика) обробляли біотинільованими антитілами проти 4-, 7-, 2- або 4-субодиниць nAChP протягом 15 хв за кімнатної температури. Оптимальну концентрацію антитіл підбирали відповідно до результатів імуоферментного тесту з антигенними фрагментами субодиниць. Після відмивання кліти-

ни інкубували зі стрептавідином, міченим ФЕ, упродовж 15 хв, потім знову відмивали та аналізували на протоковому цитофлуориметрі EPICS-XL («Coulter-Beckman», Франція) з відповідним програмним забезпеченням. Інші порції клітин фарбували ФІТЦ-міченими антитілами проти CD19 та ФЕ-міченими антитілами проти CD22 і досліджували подібним чином.

Клітини, розсаджені в 96-лункові планшети ( $1,5 \cdot 10^4$  клітин на лунку в 100 мкл середовища), інкубували з епібатидином (1 та 10 мкм) або МЛІА (25 та 100 нМ) за температури 37 °С протягом 48 год. Кількість живих клітин вимірювали за включенням тіазолілу блакитного [11].

**Результати і обговорення.** Антитіла, отримані проти коротких фрагментів субодиниць nAChP щура, специфічно зв'язують відповідні субтипи nAChP на нейронах автономних гангліїв щура і морської свинки [9, 10] та на В-лімфоцитах миші [6–8]. Антигенні фрагменти субодиниць 4, 2 і 4 абсолютно ідентичні у nAChP щура і людини, фрагмент 7-субодиниці містить дві консервативні заміни (Lys на Arg і Ser на Asn), тому антитіла повинні зв'язувати відповідні nAChP людини. Пептид, використаний для одержання 4-специфічних антитіл (AVGT-YNTRKYEC), високогомологічний відповідному фрагменту 2-субодиниці як щура, так і людини (ATGTYNSKKYDC). Зважаючи на це, за допомогою антитіл можна ідентифікувати 2-вмісні nAChP (UniProtKB ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org))).

Відповідно до літературних даних [4] клітини Daudi експресують мРНК субодиниць 2, 5, 6 та 7, але не 4 nAChP, через це зв'язування 4/2-специфічного антитіла, принаймні, на цій клітинній лінії було віднесене до 2-вмісних nAChP.

Ми порівняли зв'язування nAChP-специфічних антитіл з клітинами лімфом, що відповідають різним стадіям диференціації В-лімфоцитів: пре-В-клітинам (REH), зрілим В-лімфоцитам (Ramos) та В-лімфобластам (Daudi) (каталожні номери ATCC CRL-8286 (REH), CRL-1596 (Ramos), CCL-213 (Daudi) [13, 14]). Як показано на рис. 1, найсильніше зв'язування антитіл спостерігалось на клітинах Daudi, найслабше – на клітинах REH, тобто абсолютна кількість nAChP збільшувалася по мірі дозрівання і активації В-лімфоцитів. Найбільшу

різницю у зв'язуванні 4/2-специфічного антитіла визначено для клітин REH і Ramos (приблизно у 16 разів в умовних одиницях флуоресценції). Зв'язування 7-, 2- та 4-специфічних антитіл у клітинах REH і Ramos вище для перших у 5, 4 та 7 разів відповідно. На відміну від REH клітини Ramos експресують зрілу форму антиген-специфічного рецептора (BCR) та  $\alpha$ -ланцюг його сигнального модуля CD79 (DSMZ online Catalogue [http://www.dsmz.de/human\\_and\\_animal\\_cell\\_lines](http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines)).

Ми порівняли ці клітини за експресією CD19 (ко-рецептор BCR) та CD22 (негативний регулятор сигналізу BCR). Дані, представлені на рис. 2, свідчать про те, що клітини Ramos експресують більше CD19 і значно більше CD22, ніж REH. Це означає, що диференціація В-лімфоцитів людини, пов'язана з експресією антиген-специфічного рецептора, супроводжується посиленням експресії переважно 4/2-вмісного nAChR, тобто саме цей субтип, скоріш за все, відповідає за регуляцію процесів, опосередкованих BCR. Вищенаведене погоджується з результатом, отриманим на В-лімфоцитах миші, де кількість 4-вмісних nAChR сягає максимуму в зрілих В-лімфоцитах кісткового мозку після експресії повноцінного BCR [6].

Клітинні лінії Ramos і Daudi, що належать до одного типу пухлин (лімфома Беркітта), були неідентичними за кількістю експресованих nAChR. Інтенсивність флуоресценції зв'язаного 4/2-специфічного антитіла виявилася майже однаковою, 7- і 2-специфічних антитіл – втричі, а 4-специфічних антитіл – у 7 разів більше на клітинах Daudi порівняно з Ramos (рис. 1). Оскільки стадія диференціації клітин лінії Daudi відповідає активованим В-лімфоцитам (лімфобластам) (ATCC: The global bioresource center ([www.atcc.org](http://www.atcc.org))), одержані дані підтверджують, що активація В-клітин супроводжується посиленням експресії 7-, 2- та 4-вмісних, але не 4/2-вмісних nAChR. Це узгоджується з нашими результатами про те, що активація В-лімфоцитів миші антитілами проти CD40 призводить до посилення експресії 7-вмісних nAChR [12].

Проліферація клітин отриманої нами гібридою 1D6 (що продукує антитіла проти субодиниці nAChR) та пре-В-лімфоми курчат DT40 [13] блокується  $\alpha$ -кобратоксином і МЛА, специфічними

антагоністами 7-вмісних nAChR [8, 14], тобто функціонування цього субтипу nAChR є необхідним для підтримки клітинного проліферативного потенціалу. Натомість клітини REH, Ramos і Daudi виявилися нечутливими до 7-специфічних лігандів: ні епібатидин (агоніст широкого спектра nAChR), ні МЛА не впливали на кількість живих клітин після 3 діб інкубації (даних не наведено).

Загалом, одержані дані свідчать про те, що клітини В-лімфоїдного походження людини подібно до відповідних клітин миші і курчати містять декілька субтипів nAChR. Рівень їхньої експресії підвищується по мірі диференціації В-лімфоцитів. Різні субтипи nAChR, вірогідно, виконують різні функції, оскільки зростання експресії 4/2-вмісних nAChR супроводжує процес формування зрілого антиген-специфічного рецептора (BCR), а збільшення експресії 7-вмісних nAChR – перехід від стадії зрілого лімфоцита до лімфобласта. Зв'язування специфічних лігандів nAChR (як агоністів, так і антагоністів) не впливає на інтенсивність проліферації досліджених клітин.

Роботу підтримано грантами компаній «Philip Morris USA» та «Philip Morris Int».

*D. M. Omelchenko, M. V. Skok*

Expression of nicotinic acetylcholine receptors on human B-lymphoma cells

Summary

**Aim.** To find a correlation between the level of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) expression and B lymphocyte differentiation or activation state. **Methods.** Expression of nAChRs in the REH, Ramos and Daudi cell lines was studied by flow cytometry using nAChR subunit-specific antibodies; cell proliferation was studied by MTT test. **Results.** It is shown that the level of 4/2/4 and 7 nAChRs expression increased along with B lymphocyte differentiation (Ramos > REH) and activation (Daudi > Ramos) and depended on the antigen-specific receptor expression. The nAChR stimulation/blockade did not influence the intensity of cell proliferation.

**Keywords:** nicotinic acetylcholine receptor, B-lymphocytes.

*Д. Н. Омельченко, М. В. Скок*

Экспрессия никотиновых ацетилхолиновых рецепторов на клетках В-лимфом человека

Резюме

**Цель.** Определить связь между уровнем экспрессии никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR) и степенью дифференциации и активации В-лимфоцитов. **Методы.** Экспрессию

нАХР на клеточных линиях REH, Ramos и Daudi изучали методом проточной цитофлуориметрии с использованием антител, специфичных к разным субъединицам рецептора; пролиферацию клеток оценивали по результатам МТТ-теста. **Результаты.** Показано, что уровень экспрессии  $\alpha 2/4$  и  $\alpha 7$  нАХР повышается по мере дифференциации (Ramos > REH) и активации В-лимфоцитов (Daudi > Ramos) и зависит от экспрессии антиген-специфического рецептора. Стимуляция/блокирование нАХР не влияет на интенсивность пролиферации исследованных клеток.

**Ключевые слова:** никотиновый ацетилхолиновый рецептор, В-лимфоциты.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Paterson D., Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain // Prog. Neurobiol.–2000.–**61**, N 1.–P. 75–111.
2. Conti-Fine B. M., Navaneetham D., Lei S., Maus A. D. Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? // Eur. J. Pharmacol.–2000.–**393**, N 1–3.–P. 279–294.
3. Grando S. A. Cholinergic control of epidermal cohesion in norm and pathology // Exp. Dermatol.–2006.–**15**, N 4.–P. 265–282.
4. Kawashima K., Fujii T. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function // Front. Biosci.–2004.–**9**–P. 2063–2085.
5. Wang H., Yu M., Ochani M., Amella C. A., Tanovic M., Sursarla S., Li J. H., Yang H., Ulloa L., Al-Abed Y., Czura C. J., Tracey K. J. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation // Nature.–2003.–**421**, N 6921.–P. 384–388.
6. Skok M., Grailhe R., Agenes F., Changeux J. P. The role of nicotinic acetylcholine receptors in lymphocyte development // J. Neuroimmunol.–2006.–**171**, N 1–2.–P. 86–98.
7. Skok M. V., Grailhe R., Agenes F., Changeux J. P. The role of nicotinic receptors in B-lymphocyte development and activation // Life Sci.–2007.–**80**, N 24–25.–P. 2334–2336.
8. Skok M. V., Kalashnik E. N., Koval L. N., Tsetlin V. I., Utkin Y. N., Changeux J. P., Grailhe R. Functional nicotinic acetylcholine receptors are expressed in B lymphocyte-derived cell lines // Mol. Pharmacol.–2003.–**64**, N 4.–P. 885–889.
9. Skok M. V., Voitenko L. P., Voitenko S. V., Lykhmus E. Y., Kalashnik E. N., Litvin T. I., Tzartos S. J., Skok V. I. Alpha subunit composition of nicotinic acetylcholine receptors in the rat autonomic ganglia neurons as determined with subunit-specific anti- $\alpha(181-192)$  peptide antibodies // Neurosci.–1999.–**93**, N 4.–P. 1427–1436.
10. Koval O. M., Voitenko L. P., Skok M. V., Lykhmus E. Y., Tsetlin V. I., Zhmak M. N., Skok V. I. The  $\alpha 7$ -subunit composition of nicotinic acetylcholine receptors in the neurons of the guinea pig inferior mesenteric ganglion // Neurosci. Lett.–2004.–**365**, N 2.–P. 143–146.
11. Carmichael J., DeGraff W. G., Gazdar A. F., Minna J. D., Mitchell J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity // Cancer Res.–1987.–**47**, N 4.–P. 943–946.
12. Koval L. M., Lykhmus O. Yu., Omelchenko D. M., Komisarenko S. V., Skok M. V. The role of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in B lymphocyte activation // Ukr. Biochem. J.–2009.–**81**, N 4.–P. 5–11.
13. Buerstedde J. M., Reynaud C. A., Humphries E. H., Olson W., Ewert D. L., Weill J. C. Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line // EMBO J.–1990.–**9**, N 3.–P. 921–927.
14. Omelchenko D. M., Kalashnik O. M., Koval L. M., Komisarenko S. V., Skok M. V. Analysis of signaling pathways activated by nicotinic acetylcholine receptors in  $\alpha 7$ -lymphocyte-derived cells // Ukr. Biochem. J.–2009.–**81**, N 1.–P. 59–66.

УДК 577.27

Надійшла до редакції 14.09.09