

УДК: 576.3

## Взаимодействие цитокина LIF с липидным матриксом мембран

М. П. Борисова<sup>1</sup>, Л. М. Межевикина<sup>2</sup>, Р. Р. Петрова<sup>2,a</sup>

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 3

<sup>2</sup> Учреждение Российской академии наук Институт биофизики клетки РАН,  
142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 3

E-mail: <sup>a</sup>rushap@rambler.ru

Получено 15 марта 2010 г.

Встраивание белка LIF в бислойную липидную мембрану вызывает образование ионных каналов. Приведены данные о работе ионных каналов, образованных рекомбинантным белком мыши и человека. Показана разница в действии белка LIF эукариотического и прокариотического происхождения.

Ключевые слова: LIF (Leukemia Inhibitory Factor), рекомбинантный белок, ионный канал

### Interaction of cytokine LIF with the lipidic matrix of membranes

M. P. Borisova<sup>1</sup>, L. M. Mezhevikina<sup>2</sup>, R. R. Petrova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Experimental and theoretic biophysics RAS, 3 Institutskaya str., Pushchino, Moscow region, 142290, Russia

<sup>2</sup> Institute of Biophysics of Cell RAS, 3 Institutskaya str., Pushchino, Moscow region, 142290, Russia

**Abstract.** – Integration of LIF protein into the bilayer lipid membrane causes the formation of ion channels. The data on activity of ion channels formed by recombinant protein from mouse and human origin are shown. Also the difference in the effect of LIF protein from eukaryotic and prokaryotic origin is shown.

Keywords: LIF (Leukemia Inhibitory Factor), recombinant protein, ion channel

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2010, vol. 2, no. 1, pp. 43–49 (Russian).

## Введение

К настоящему времени известно множество белков, которые играют важную роль в передаче информации в клетки. Некоторые из них передают сигнал, взаимодействуя с рецепторами, другие встраиваются непосредственно в мембрану и осуществляют изменение ионного потока, регулируя активный или пассивный транспорт ионов через клеточные мембраны. Значительная часть белков, контролирующая электрохимический градиент, образует в мембранах специальные структурные образования – ионные каналы. Эти каналы могут быть высокоспецифичны и, обладая высокой селективностью, жестко контролировать поток ионов через клеточную мембрану. Собственно в физиологическом смысле эти структуры решают вопросы жизни и смерти клетки или вносят серьезные коррективы в их функциональный статус. Поэтому белки-каналоформеры привлекают последние 20–30 лет к себе особенное внимание исследователей.

За это время накопилось достаточно данных о структуре, способе и механизме действия их на молекулярном уровне. Теперь можно сказать достаточно определенно, что около 340 генов кодируют ионные каналы. Они играют важную роль в таких процессах как проведение нервного и мускульного возбуждения, гормональная секреция, клеточное деление, чувствительная трансдукция, процесс обучения и памяти, регуляция давления крови, водного и солевого баланса, размножение лимфоцитов, фертилизация и клеточная гибель. Понятно, что некоторые нарушения в работе таких ионно-канальных комплексов могут привести к значительному сбою в функционировании клетки или целого организма. К настоящему времени известно, что мутации около 60 ионно-канальных генов являются причиной человеческих заболеваний [Ashcroft, 2006]. Из-за такой важной функциональной роли, их мембранной локализации, структурной гетерогенности и тканевой видоспецифичности ионные каналы стали мишенью для применения различной лекарственной терапии. Применяемые лекарства, такие как локальные анестетики, седативные и антидепрессантные агенты, антидиабетические препараты оказывают лечебный эффект в первую очередь своим взаимодействием с ионными каналами.

В данной работе приводятся результаты исследования белка LIF. Его вполне можно отнести к группе веществ, играющих важную роль в функционировании и клетки, и организма в целом, поскольку он относится к цитокинам, которые регулируют межклеточные и межсистемные взаимодействия, определяют выживаемость клеток, стимуляцию или подавление их роста, дифференцировку и функциональную активность. Они обеспечивают согласованность действия иммунной, эндокринной и нервной систем в нормальных условиях и в ответ на патологическое воздействие.

Цитокин LIF секретируется в различных клетках и тканях, клеточных линиях, включая гепатоциты, адипоциты, остеобласты, нейрональные, мышечные клетки и эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) [Davis et al., 1993; Auernhammer, Melmed, 2000]. Показано, что продукция LIF взаимосвязана с процессами инфекции и воспаления [Wesselingh et al., 1994]. Физиологически наиболее важное и интересное место продукции LIF – это эндометрий [Auernhammer, Melmed, 2000]. Максимального значения концентрация LIF в эндометрии достигает в период имплантации бластоцисты в матку, и, таким образом, данный цитокин играет ключевую роль в процессах поддержания беременности у животных и человека [Vogiagis, Salamonsen, 1999; Dimitriadis et al., 2005].

Интерес к молекулярному механизму действия LIF вызывается тем, что он является обязательным компонентом сред при работе со стволовыми клетками не только для их культивирования и последующей дифференцировки, но, как стало известно в последнее время, и для формирования полноценного органа с его специфическими функциями.

Все работы, в которых исследуется белок LIF, относят его к белкам, взаимодействующим с клеткой через рецепторную систему. Рецептор представляет собой гетеромер, состоящий из 2 белков: LIF-R и трансмембранного белка gp130. Связывание лиганда с рецептором активирует

в ЭСК млекопитающих систему транспортных сигнальных белков JAK-STAT3, MAPK, PI3K [Raz et al., 1999; Voiani, Scholer, 2005; Izumi, 2006]. Гены-мишени, активируемые этими сигнальными системами, ответственны за плюрипотентность ЭСК, дифференцировку и пролиферацию. Глубоко изученная, хорошо аргументированная на молекулярном уровне схема взаимодействия белка LIF и клетки послужила гарантом единственного представления о механизме такого взаимодействия.

В 2002 году нами была предпринята попытка исследовать взаимодействие белка LIF с самим липидным матриксом. Она подала надежду на несколько более полное представление о взаимодействии белка LIF с клеткой [Серышева и др., 2002]. С появлением возможности использовать в наших исследованиях рекомбинантные белки LIF, нами была продолжена работа в этом направлении. Полученные нами экспериментальные данные однозначно свидетельствовали, что белок LIF встраивается в липидный матрикс с образованием ионного канала. Такой канал демонстрирует сложное поведение с зависимостью от концентрации окружающей среды, от знака потенциала и величины приложенного напряжения [Борисова и др., 2009]. Поэтому наша работа была посвящена исследованию механизмов взаимодействия рекомбинантного LIF различного происхождения с искусственной липидной мембраной.

## Материалы и методы

В работе были использованы: рекомбинантный белок LIF, продуцируемый эукариотическими клетками линии Cos-1, полученный в лаборатории механизмов рецепции ИБК РАН [Петрова и др., 2006а]; коммерческий рекомбинантный мышинный LIF прокариотического происхождения (ICN); коммерческий рекомбинантный белок человека прокариотического происхождения (Sigma).

Для получения рекомбинантного белка LIF в эукариотических клетках использовали плазмидную конструкцию pcDNA3-*lif* и линию Cos-1. По достижении 70 % монослоя клетки Cos-1 трансфицировали 1.0 мкг/мл pcDNA3-*lif* с помощью агента липофектамин 2 000 (Invitrogen) по методу (<http://www.invitrogen.com>). Для контроля эффективности трансфекции использовали маркерный вектор pEGFP-C1 (Invitrogen). Селекцию *lif*-трансфицированных клеток линии Cos-1 проводили в течение 2-х недель в среде ДМЕМ с добавлением 300 мкг/мл селективного антибиотика генетицина G418 (Sigma). Для подтверждения наличия в ДНК гена *lif neo+*-позитивные клоны Cos-1 анализировали с помощью ОТ-ПЦР с использованием прямого (5'-АТАГААТTCGAAGGTCTTGGCCGCA-3'), обратного (5'-АТАААGCTTCTAGAAGGCCTGGACCA-3') праймеров и системы SuperScript III RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen).

Оценку экспрессии и концентрацию растворимого рекомбинантного LIF белка определяли методом иммуноферментного анализа клеточного лизата и среды, в которой культивировали клоны Cos-1 с плазмидной вставкой гена *lif* мыши, против анти-LIF-моноклональных антител (Chemicon), а также иммуноцитохимического окрашивания Cos-*lif*. Тестирование активности LIF проводили на высоко зависимых от LIF в среде культивирования клеток ЭСК мыши линии R1. Основным критерием активности LIF-Cos служило морфофункциональное состояние культуры R1, при этом основное внимание обращали на наличие плюрипотентных свойств, способности размножаться в виде колоний, активности эндогенной щелочной фосфатазы и пролиферативную активность.

Для электрофизиологических исследований рекомбинантного белка LIF и образования бислоя использовался липидный раствор из фосфатидилхолина из сои (Sigma) в гептане, в качестве буфера использовался трис (Sigma) и ХЕПЕС (Sigma). Измерения проводились в растворах KCl различной ионной силы при pH = 7.15 – 7.2 в условиях фиксации потенциала с программным обеспечением «БЛИМ», разработанным А. Я. Зильберштейном. Знак потенциала указан для наружного отсека ячейки (транс), противоположного отсеку, где присутствовал белок. Среда культивирования нетрансфицированных клеток служила контролем.

## Результаты

При внесении различных концентраций LIF с одной стороны от мембраны (цис) наблюдалось изменение проводимости липидного бислоя. На рис. 1 приведена оригинальная запись изменения тока в ответ на приложенный потенциал. Запись велась в миллисекундном диапазоне. Видно, что это запись одного канала с частыми попытками отключения, и видно также, что при разных знаках потенциала ток изменяется по-разному. При приложенном напряжении  $-100$  мВ проводимость в  $20$  рА при изменении знака на плюс имеет проводимость в  $4$  рА.

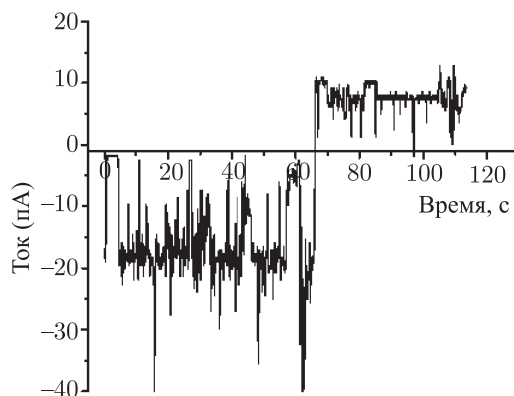


Рис. 1. Запись тока через мембрану при  $-100$  мВ и  $100$  мВ; концентрация LIF (COS) –  $19,5$  нг/мл (цис); среда – KCl  $1$  М; липид – фосфатидилхолин  $20$  мг/мл

Величина скачков зависит от ионной силы окружающего раствора. Чем меньше концентрация соли, тем больше величина тока, проходящего через одну такую токопроводящую единицу. Так в  $0,1$  М KCl при  $100$  мВ подаваемого напряжения средняя величина тока  $90 \pm 20$  пА, в  $0,2$  М KCl –  $22 \pm 6$  пА, в  $1$  М KCl –  $7 \pm 1$  пА. Средняя проводимость одиночного канала также зависит от знака потенциала – при отрицательном знаке средняя амплитуда одиночных скачков тока выше, чем при положительном, так в  $0,1$  М KCl средняя величина тока –  $175 \pm 19$  пА, в  $1$  М KCl –  $16 \pm 1$  пА (по сравнению с  $90$  пА и  $7$  пА соответственно). При исследовании воздействия белка LIF на искусственный липидный бислой невозможно достичь стационарной проводимости или относительно невысокой скорости ее нарастания. Поэтому обсуждается только качественная характеристика изменения интегрального тока через мембрану. Приведенные на рис. 2 вольтамперные характеристики сняты в одной области величин интегрального тока через мембрану в присутствии LIF. Учитывая это, можно констатировать, что в растворах  $0,1$  М KCl зависимость тока от напряжения носит линейный характер, в  $0,2$  М – наблюдается гиперфункция в условиях положительного потенциала с транс-стороны, и суммарный ток при  $100$  мВ почти в два раза больше, чем при таком же потенциале обратного знака.

В условиях  $1$  М KCl интегральная зависимость тока носит обратный характер, в то же время на рис. 1 видно, что проводимость одного и того же канала в этих условиях так и осталась выше при отрицательном потенциале. Внесение  $10$  мМ  $CaCl_2$  не изменяет вольтамперные характеристики мембраны в присутствии LIF. Величина одиночных скачков остается практически без изменений (в  $1$  М KCl при  $100$  мВ –  $11 \pm 5$  пА, при  $-100$  мВ средняя величина тока –  $20 \pm 1$  пА). Различие в действии на клетки LIF эукариотического и прокариотического происхождения связывают с отсутствием посттрансляционного гликозилирования белка у бактерий, которые продуцируют его. В этой связи представлялось интересным сравнить действие рекомбинантного белка LIF, продуцированного эукариотическими клетками линии Cos-1, с рекомбинантным белком прокариотического происхождения фирмы ICN. Мембраны формировались из лецитина, концентрация белка мало отличалась от использованной для LIF из трансфицированных Cos-1. При напряжении в  $100$  мВ ток через такую мембрану изменяется хаотично и не выявляет стабильных уровней проводимости в миллисекундном диапазоне измерений (рис. 3), но зависимость тока от напряжения сохраняет S-образный вид (рис. 4)

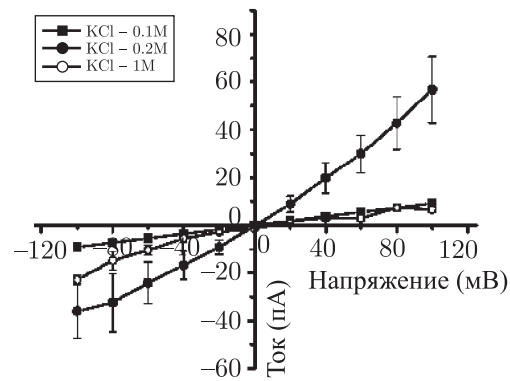


Рис. 2. Вольтамперные характеристики в растворах KCl 0,1мМ; 0,2мМ; 1М; концентрация LIF (Cos-1) – 0,65 нг/мл (цис); липид – фосфатидилхолин 20 мг/мл

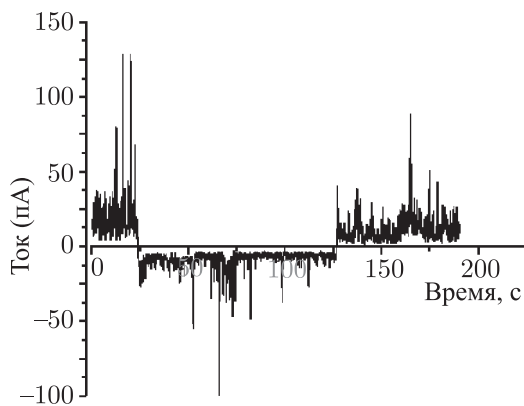


Рис. 3. Флуктуации тока через мембрану из фосфатидилхолина (20 мг/мл) в присутствии LIF (ICN) – 2 нг/мл (цис); напряжение 100 мВ, –100 мВ; KCl – 1М + 10 мМ CaCl<sub>2</sub>

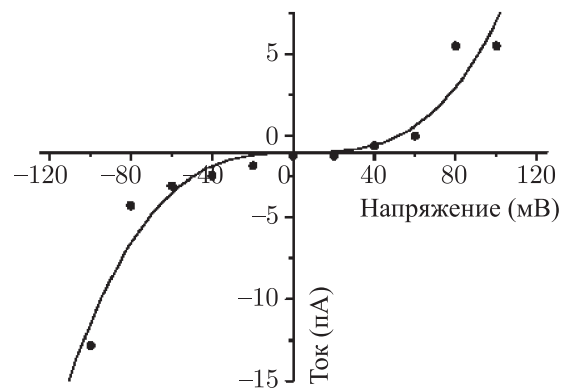


Рис. 4. Вольтамперная характеристика мембраны из фосфатидилхолина (20 мг/мл); концентрация LIF (ICN) – 2 нг/мл (цис); KCl – 1М + 10 мМ CaCl<sub>2</sub>

Ранее в нашей работе мы показали, что внесение в среду 10мМ CaCl<sub>2</sub> не влияет на интегральные токовые характеристики и работу одиночных ионных каналов, образующихся в мембране в присутствии LIF. У нас была возможность сравнить действие рекомбинантного LIF человека прокариотического происхождения с рекомбинантным мышинным LIF прокариотического происхождения.

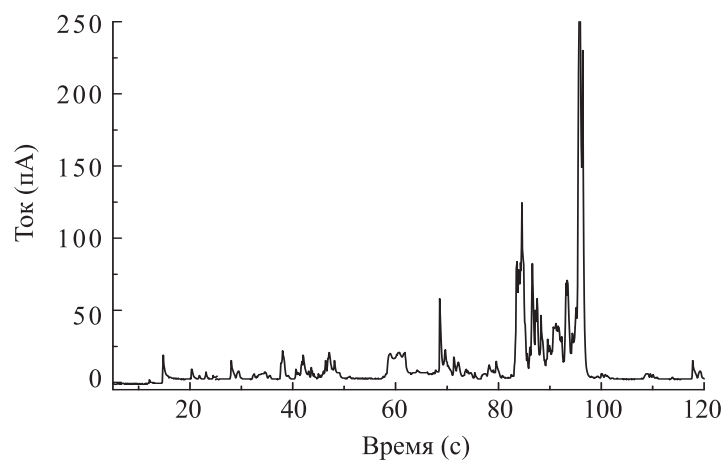


Рис 5. Флуктуации тока через мембрану из фосфатидилхолина 20 мг/мл.; LIF human 0.8 нг/мл; среда KCl – 1М

На рисунке 5 мы видим результат взаимодействия белка LIF human с бислойной липидной мембраной. В идентичных условиях, при сравнимых концентрациях токовая характеристика этого канала значительно отличается от токовой характеристики канала, образованного LIF мыши прокариотического происхождения. В условиях градиента 2М KCl к 1М KCl селективность была слабо выражена. Вероятно, для исключения случайности надо сравнить этот результат с результатом действия белка LIF человека прокариотического происхождения, полученного неоднократно. У нас есть опыт сравнения нескольких препаратов LIF мыши, их действующая концентрация может незначительно отличаться, но токовые характеристики всегда совпадали. Несмотря на сделанное замечание, мы думаем, что результаты нашей работы позволяют надеяться, что работа ионных каналов позволяет различить не только вид организма, выработавшего изначально данный белок, но и различить систему, в которой произошла наработка данного агента.

## Заключение

Исходя из наших данных, можно сделать следующие выводы:

1. Белок LIF эукариотического происхождения образует в бислойных липидных мембранах молекулярные структуры – ионные каналы.
2. Ответственность за образование устойчивых токопроводящих структур несет, вероятно, гликозилированный участок белка.
3. Белок LIF прокариотического происхождения не образует устойчивых организованных молекулярных структур в миллисекундном диапазоне регистрации тока через мембраны, но также изменяет электропроводимость мембран.

Характеристика тока через каналы зависит от величины и знака потенциала на мембране, от ионной силы окружающего раствора, видовой специфичности белка LIF, а также от системы экспрессии рекомбинантного белка (эукариот или прокариот).

## Обсуждение

Итак, экспериментальные данные, полученные нами на бислойных липидных мембранах, указывают на возможность непосредственного влияния белка LIF на клеточную мембрану. Характер воздействия LIF на искусственный липидный бислой можно перенести на его взаимодействие с нативной клеточной мембраной *in vivo*, поскольку действующие концентрации в нашем случае были на порядок меньше, чем используют при работе с клеточными системами. Также стоит отметить, что данные по модифицирующему влиянию рекомбинантного белка LIF на бислойную липидную мембрану в зависимости от продуцента (эукариоты–прокариоты) коррелируют с различными эффектами LIF, которые он оказывает при действии на ЭСК мыши, что было показано ранее [Metcalf, 1992; Петрова и др., 2006b].

## Список литературы

- Ashcroft F. M.. From molecule to malady // Nature. 2006. № 440. P. 440–447.
- Auernhammer C., Melmed S. Leukemia-inhibitory factor – neuroimmune modulator of endocrine function // Endocrine reviews. 2000. Vol. 21. P. 313.
- Boiani M., Scholer H. R. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells // Mol. Cell Biol. 2005. Vol. 6. P. 872.
- Davis S., Aldrich T. H., Stahl N., Pan L., Taga T., Kishimoto T., Ip N. Y., Yancopoulos G. D. LIFR $\beta$  and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor // Science. 1993. Vol. 260, P. 1805.

- Dimitriadis E., White C. A., Jones R. L., Salamonsen L. A.* Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation // *Hum. Reprod. Update.* 2005. Vol. 11. Is. 6. P. 613.
- Izumi M., Masaki M., Hiramoto Y., Kuroda T., Terai K., Hori M., Kawase I., Hirota H.* Cross-talk between bone morphogenetic protein 2 and leukemia inhibitory factor through ERK 1/2 and Smad1 in protection against doxorubicin-induced injury of cardiomyocytes // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2006. Vol. 40. Is. 2. P. 224.
- Metcalf D.* Leukemia inhibitory factor – a puzzling polyfunctional regulator // *Growth Factors.* 1992. V. 7. P. 169–173.
- Raz R., Lee C. K., Cannizzaro L. A.* Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. Vol. 96. P. 2846.
- Vogiagis D., Salamonsen L.* The role of leukemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy // *J. Endocrinol.* 1999. Vol. 160. P. 181.
- Wesselingh S. L., Levine B., Fox R. J., Choi S., Griffin D. E.* Intracerebral cytokine mRNA expression during fatal and nonfatal alphavirus encephalitis suggests a predominant type 2 T cell response // *J. Immunol.*, 1994. Vol. 152. P. 1289–1297.
- Борисова М. П., Межевикина Л. М., Петрова Р. Р., Фесенко Е. Е.* ЛИФ-как фактор воздействия на липидный бислой // *Биофизика.* 2009. Вып. 54. № 4. Стр. 688.
- Петрова Р. Р., Межевикина Л. М., Калошин А. А.* Экспрессионная система для получения рекомбинантного белка со свойствами цитокина LIF в клетках линии Cos-1 // *Биотехнология.* 2006а. № 5. С. 40–45.
- Петрова Р. Р., Межевикина Л. М., Фесенко Е. Е.* Дифференцировка эмбриональных стволовых клеток в кардиомиоциты с помощью цитокина LIF (Leukemia Inhibitory Factor) // *Биофизика.* 2006b. Том 51. Вып. 2. С. 310–315.
- Серышева В. В., Борисова М. П., Межевикина Л. М.* // *Бюллетень эксперим. биологии и медицины.* 2002. № 134. Вып. 12. С. 620.