

УДК 612.036.576.314.547.915.5

Комплекс Tag7–Mts1 вызывает миграцию лимфоцитов, взаимодействуя с рецепторами CCR5 и CXCR3

Т. Н. Шарапова, Е. А. Романова, Л. П. Сащенко, Д. В. Яшин*

Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

*E-mail: yashin_co@mail.ru

Поступила в редакцию 02.08.2018

Принята к печати 02.10.2018

РЕФЕРАТ Обнаружение новых хемокинов, индуцирующих миграцию лимфоцитов к очагу поражения, важно для направленного поиска средств для иммунотерапии. Недавно мы показали, что белок Tag7 (PGLYRP1) системы врожденного иммунитета образует с Ca^{2+} -связывающим белком Mts1 (S100A4) стабильный комплекс, способный индуцировать движение лимфоцитов, хотя каждый из этих белков, взятый по отдельности, такой активностью не обладает. Цель настоящего исследования состояла в выявлении рецепторов, индуцирующих миграцию лимфоцитов по градиенту концентрации комплекса Tag7–Mts1, и компонентов этого комплекса, способных взаимодействовать с этими рецепторами. В работе изучена миграция РВМС человека под действием комплекса Tag7–Mts1. Мононуклеарные клетки периферической крови здоровых доноров выделяли с помощью стандартной процедуры центрифугирования в градиенте Ficoll-Нураque. Установлено, что движение мононуклеарных клеток периферической крови по градиенту концентрации комплекса Tag7–Mts1 индуцируется классическими хемотаксическими рецепторами CCR5 и CXCR3. Показано, что только Mts1 способен связываться с внеклеточным доменом CCR5, однако этого связывания недостаточно для индукции движения клеток. Сравнительный анализ первичной и пространственной структур трех белков выявил гомологию фрагментов аминокислотных последовательностей белков комплекса Tag7–Mts1 с различными участками лиганда CCR5-рецептора – белка MIP1 α . Следует отметить, что комплекс Tag7–Mts1 можно рассматривать как новый лиганд классических хемотаксических рецепторов CCR5 и CXCR3.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА комплекс Tag7–Mts1, хемотаксис, хемокин, хеморецептор.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ РВМС – мононуклеарные клетки периферической крови; HLA – антиген тканевой совместимости (лейкоцитарный антиген человека); CCR5 и CXCR3 – хеморецепторы; TNFR1 – рецептор фактора некроза опухоли; TNF α – фактор некроза опухоли; Tag7 (PGLYRP1) – белок врожденного иммунитета; Mts1 (S100A4) – Ca^{2+} -связывающий белок; MIP1 α – воспалительный белок макрофагов, хемокин; NK – естественные киллеры; PMSF – *n*-фенилметилсульфонилфторид.

ВВЕДЕНИЕ

Для развития иммунного ответа необходимы, как минимум, два этапа: активация эффекторных лимфоцитов, способных убивать чужеродные клетки, и доставка их к очагу поражения. Поэтому для понимания процессов иммунной защиты следует иметь представление как о цитотоксических, так и о хемотаксических механизмах [1]. Важен также и поиск новых стимуляторов цитотоксичности и хемотаксичности.

Цитокины, вызывающие миграцию лимфоцитов, именуется хемокинами. Одна из особенностей структуры хемокинов – две характерные дисульфидные связи. В зависимости от взаимного расположения

первых двух N-концевых остатков цистеина хемокины делят на четыре класса (CC, C, CXC, CX₃C) [2]. Индукция хемотаксиса происходит через взаимодействие со специфическими хемотаксическими рецепторами. Эти рецепторы относятся к большой группе трансмембранных рецепторов, сопряженных с G-белком [3]. Взаимодействие хемокина с рецептором вызывает диссоциацию β -, γ -субъединиц G-белка, что приводит к активации каскада протеинкиназ и увеличению концентрации ионов Ca^{2+} [4, 5].

Вторая структурная особенность хемокинов – их небольшая молекулярная масса (от 8–10 кДа) [6], но встречаются стимуляторы миграции лимфоцитов

как с большей, так и с меньшей молекулярной массой [7]. Недавно мы показали, что миграцию лимфоцитов может вызывать комплекс из двух белков: Tag7 и Mts1 [8].

Mts1 (S100A4) принадлежит к семейству Ca^{2+} -связывающих белков. Известно, что он вовлечен в процесс метастазирования опухолевых клеток [9–12]. В то же время его ген активно экспрессируется в клетках иммунной системы, участвующих в противоопухолевой защите. Ранее мы показали, что Mts1 на поверхности CD4⁺ лимфоцитов участвует в узнавании HLA-отрицательных опухолевых клеток и способствует их лизису [13].

Белок Tag7 (PGLYRP1), ген которого был открыт в нашем институте, является белком системы врожденного иммунитета, участвующим как в антибактериальной, так и в противоопухолевой защите [14–16]. Подобно цитокинам, Tag7 способен активировать цитотоксичность лимфоцитов. В комплексе с основным белком теплового шока Tag7 оказывает цитотоксическое действие на TNFR1-несущие опухолевые клетки и тормозит рост опухоли [17, 18]. Он способен взаимодействовать с белком Mts1 с образованием стабильного хемоаттрактивного комплекса, вызывая миграцию лимфоцитов, при этом ни Mts1, ни Tag7, взятые по отдельности, такой активностью не обладают [8]. В связи с этим интересно выяснить, почему хемотаксическая активность появляется только после образования комплекса.

Цель настоящего исследования состояла в выявлении рецепторов, индуцирующих миграцию клеток по градиенту концентрации Tag7–Mts1 и белка двухкомпонентного комплекса, способного взаимодействовать с этими рецепторами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Белки

Рекомбинантные белки Mts1 (S100A4) и Tag7 (PGLYRP1) экспрессировали в штамме *Escherichia coli* M15[pREP4] (Qiagen, США), содержащем плазмиду pQE-30 (Qiagen, США). В плазмиды pQE-30 ранее были клонированы кДНК белка Tag7 или Mts1. Mts1 очищали на Ni-NTA-агарозе (Qiagen, США) согласно протоколу производителя. Tag7 выделяли и очищали как описано в [19].

Сравнение первичных и пространственных структур белков проводили с использованием <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> и базы данных <https://ncbi.nlm.nih.gov/>.

Клеточные культуры

В работе использовали мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), полученные из лей-

комассы здоровых доноров последовательным центрифугированием в градиенте Ficoll-Нураque (GE Healthcare, Швеция) как описано в [20].

Проточная цитофлуориметрия

Клетки фиксировали в 4% формальдегиде (Sigma) и инкубировали с антителами к CCR5 и CXCR3 (Abcam, Великобритания) в течение ночи, а затем с антикроличьими IgG-PE (Beckman coulter, США) в темноте при 4°C в течение 2 ч. В каждой пробе анализировали не менее 10⁴ клеток. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 MPL (Beckman coulter, США), данные обрабатывали в EXPO32 software (Applied Cytometry Systems, Sheffield, Великобритания).

Анализ хемотаксической активности

Для измерения хемотаксической активности использовали камеру Бойдена (Costar Corning Inc., США), в верхнюю часть которой добавляли 200×10³ клеток РВМС, в нижнюю – хемоаттрактант в концентрации 10⁻⁹ М в среде RPMI 1640 (Gibco, США). Количество клеток, прошедших через мембрану, измеряли через 1.5 ч с помощью МТТ-теста (Sigma, США). В случае с преинкубацией антитела (в разведении 1 : 1000) или белки (Tag7, Mts1 в концентрации 10⁻⁸ М) добавляли к РВМС и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂, после чего дважды промывали средой. Все диаграммы, если не указано иначе, построены на основе не менее трех независимых экспериментов. Для статистической обработки использовали метод двусторонней ANOVA.

Детекция хеморецепторов

Клетки РВМС (~250 млн) суспендировали в 1.5 мл солюбилизационного буфера: 50 мМ Трис, рН 7.5 с PMSF (Sigma, США) (1 мМ) и коктейлем ингибиторов протеаз (Calbiochem, Германия) в концентрации, указанной изготовителем, и детергентом Triton X-100 (Sigma, США) (1% по объему). После инкубации на качалке в течение 30 мин на льду полученную суспензию разводили в 10 раз, добавляя солюбилизационный буфер, не содержащий детергент, и центрифугировали при 185000 g (Beckman L7 Ultracentrifuge, США) в течение 1 ч при 4°C. Супернатант отбирали и наносили на Br-CN-сефарозную колонку с конъюгированным Mts1. Связавшиеся белки разделяли с помощью 12% SDS-ПААГ, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и детектировали методом вестерн-блоттинга со специфическими антителами к CCR5 и CXCR3 (1 : 1000) и вторичными антикроличьими антителами (1 : 10000), конъюгированными с пероксидазой хрена, и проявляли с помощью набора ECL Plus (Amersham,

Великобритания) согласно рекомендациям производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Хемотаксические рецепторы CCR5 и CXCR3 индуцируют движение лимфоцитов по градиенту концентрации комплекса Tag7–Mts1

На первом этапе исследования мы выявляли рецепторы, участвующие в передаче хемотаксического сигнала от описанного нами нового хемокина – Tag7–Mts1-комплекса. Ранее мы показали, что под действием этого комплекса могут направленно двигаться Т-лимфоциты и НК-клетки [8]. Поэтому мы оценивали присутствие на РВМС хемотаксических рецепторов CCR5 и CXCR3, наиболее высоко представленных на поверхности Т-лимфоцитов и НК-клеток.

С помощью проточной цитофлуориметрии и высокоспецифичных антител мы показали, что исследуемые популяции РВМС содержат 54.8% клеток, несущих на поверхности рецептор CCR5, а клетки, экспрессирующие CXCR3, составляют 58.1% от общей популяции РВМС, т.е. оба рецептора присутствуют на РВМС (рис. 1А).

Далее мы проверяли, участвуют ли эти рецепторы в индукции миграции лимфоцитов по градиенту концентрации комплекса Tag7–Mts1. С этой целью РВМС инкубировали с антителами к CCR5 или CXCR3 и исследовали движение этих клеток под действием комплекса Tag7–Mts1 (рис. 1Б). Можно видеть, что, в отличие от белков Tag7 и Mts1, взятых по отдельности, комплекс Tag7–Mts1 вызывает движение РВМС. Преинкубация с антителами к CCR5 практически полностью блокирует хемотаксис. В то же время антитела к CXCR3 снижали миграцию РВМС не более чем на 20%. Таким образом, оба исследуемых рецептора способны индуцировать движение клеток по градиенту концентрации комплекса Tag7–Mts1, но обладают различным сродством к этому комплексу. Учитывая более сильное ингибирование движения клеток антителами к CCR5, можно предположить, что пространственная структура функциональных участков комплекса Tag7–Mts1, участвующих во взаимодействии с CCR5, больше похожа на пространственную структуру участков СС-хемокинов – лигандов рецептора CCR5, обеспечивающих взаимодействие в комплексе.

Mts1 может связываться с хемотаксическими рецепторами

Далее мы определяли, какой из белков двухкомпонентного комплекса может взаимодействовать с рецепторами. Мы предварительно инкубировали РВМС с Tag7 или с Mts1 и исследовали миграцию

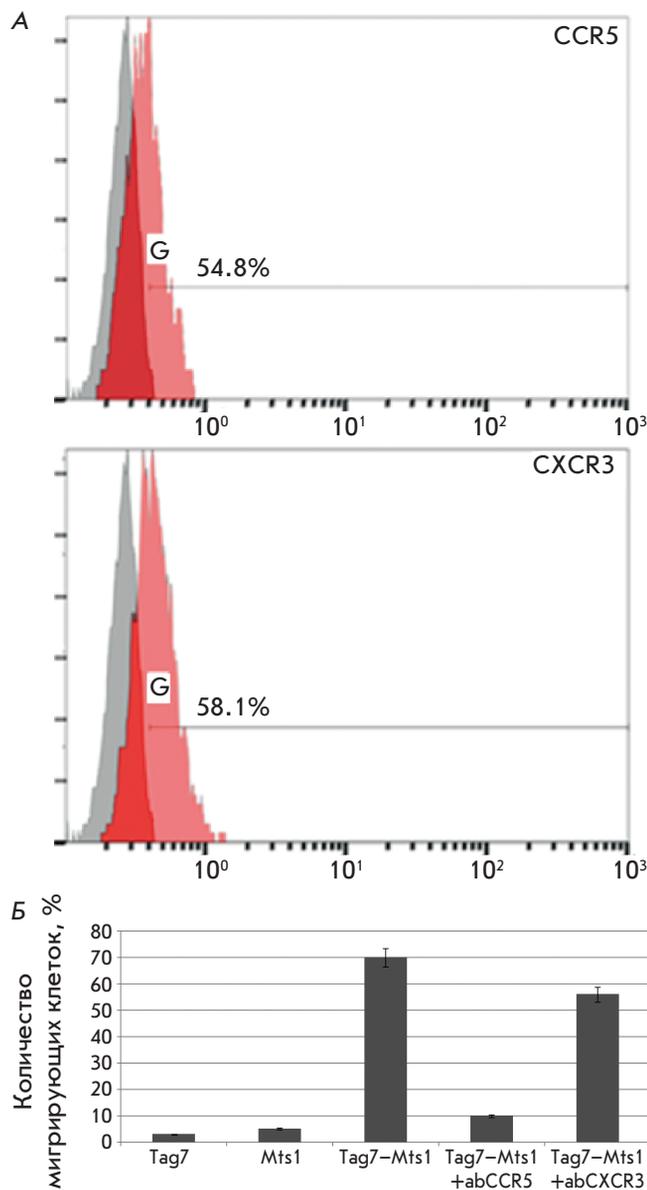


Рис. 1. Хемотаксис РВМС под действием Tag7–Mts1 осуществляется через взаимодействие с рецепторами CCR5 и CXCR3. А – экспрессия CCR5 и CXCR3 на поверхности мононуклеарных клеток. По оси абсцисс – количество событий, по оси ординат – средняя интенсивность флуоресценции. Серый пик – изотипический контроль вторичными антителами. Б – антитела к рецепторам CCR5 и CXCR3 блокируют хемотаксическую активность РВМС

таких клеток под действием комплекса Tag7–Mts1. На рис. 2А представлены результаты пяти независимых экспериментов без усреднения. Можно видеть, что в четырех случаях инкубация с Tag7 практически не влияет на подвижность клеток, а предварительная инкубация с Mts1 резко снижает движение

На рис. 3 представлены пространственные структуры комплекса MIP1 α с CCR5 [21] и пространственные структуры Tag7 [19] и Mts1 [22], координаты пространственных структур PDB ID: 5UIW, 1YCK, 3C1V соответственно. При сравнении пространственных структур белков Mts1 и Tag7 со структурой MIP1 α видно, что С-концевой участок Mts1 (аминокислотные остатки 79–89) представляет собой α -спираль, выступающую из центральной глобулярной части молекулы. У хемокина MIP1 α N-концевой участок (аминокислотные остатки 11–21) также далеко выступает из центральной части молекулы. Оба эти участка имеют по пять гидрофобных аминокислот. Фрагменты Tag7 (аминокислотные остатки 164–180) и MIP1 α (аминокислотные остатки 45–61) представляют собой β -листы, в обоих белках находящиеся на поверхности молекул. Гомологичные аминокислоты (остатки 164–166 и 179–180) расположены в области, которая у MIP1 α (остатки 45–47 и 60–61) участвует в непосредственном взаимодействии с рецептором CCR5.

Ни один из белков комплекса Tag7–Mts1 не обладает пространственной структурой хемокина, однако, Mts1 и Tag7 содержат участки, гомологичные по своей аминокислотной и пространственной структурам участкам хемокина MIP1 α , важным для активации рецептора CCR5. Возможно, в этом состоит причина того, что отдельно взятые Tag7 и Mts1 не обладают хемоаттрактантной активностью, и только стабильный двухкомпонентный комплекс этих белков способен инициировать миграцию лимфоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные данные позволяют сделать два заключения. Хемотаксические рецепторы CCR5 и CXCR3 участвуют в индукции миграции РВМС по градиенту концентрации комплекса Tag7–Mts1. Один из компонентов этого комплекса – белок Mts1 – может связываться с обоими рецепторами.

Следует отметить различную специфичность связывания комплекса Tag7–Mts1 с этими рецепторами. Исследуемый комплекс довольно слабо взаимодействует с рецептором CXCR3: не более 20% CXCR3-содержащих РВМС мигрируют по градиенту концентрации Tag7–Mts1. В то же время практически все популяции РВМС, несущие CCR5, могут двигаться под действием этого хемоаттрактанта.

CCR5 присутствует, как правило, на клетках памяти, макрофагах и дендритных клетках. Недавно было показано, что он представлен на клеточной поверхности субпопуляций НК-клеток [23]. Исходя из набора клеток, несущих CCR5, можно предполагать, что комплекс Tag7–Mts1 может привлекать клетки иммунной системы в основном на ранних стадиях иммунного ответа.

Нами показано, что предварительная инкубация клеток с белком Tag7 не ингибирует миграцию клеток под действием комплекса Tag7–Mts1. Возможно, Tag7 взаимодействует с хемотаксическим рецептором намного слабее, чем комплекс Tag7–Mts1. Tag7 не содержит также в полипептидной цепи гидрофобного фрагмента, способного связываться с трансмембранным активным центром рецептора.

Mts1, напротив, может связываться с рецептором CCR5 и ингибировать движение РВМС, хотя и не обнаружено сходства в аминокислотных и пространственных структурах центрального участка молекул Mts1 и MIP1 α . Механизм такого связывания требует дальнейшего исследования [19, 21, 22].

Аналогичные результаты получены нами недавно при исследовании взаимодействия цитотоксического комплекса Tag7–Hsp70 с рецептором известного цитокина TNF α – TNFR1. Tag7 связывался с TNFR1 и ингибировал цитотоксическое действие TNF α [24], но не обладал гомологией первичной и трехмерной структур с TNF α .

Детальное изучение механизма взаимодействия CCR5 с лигандом позволило предложить гипотетическую схему контактов этого рецептора с лигандами [25]. Согласно этой схеме, взаимодействие хемоклинового рецептора с лигандом – двухстадийный процесс. На первой стадии центральная часть молекулы хемокина взаимодействует со связывающим центром рецептора, расположенным на внеклеточном домене. Далее для активации рецептора необходимо взаимодействие N-концевого участка хемокина со вторым участком связывания, расположенным в пучке трансмембранных спиралей.

Интересно, что сам Mts1 не может индуцировать миграцию клеток, хотя имеет гидрофобный фрагмент (аминокислотные остатки 79–89), гомологичный фрагменту MIP1 α (аминокислотные остатки 11–21), индуцирующему изменение конформации рецептора. Учитывая различия в пространственной структуре Mts1 и в структуре классического хемокина, можно предположить, что после связывания с внеклеточным доменом на первой стадии взаимодействия Mts1 с рецептором CCR5 С-концевой фрагмент Mts1 не может проникнуть в мембрану клетки [22]. Взаимодействие с Tag7 изменяет, возможно, конформацию Mts1, обеспечивая доступ С-концевого участка к активному центру в трансмембранном пучке. Такая гипотетическая схема может объяснить, почему только комплекс Tag7–Mts1 способен вызывать миграцию РВМС.

По-видимому, двухстадийное взаимодействие лигандов с рецепторами является общим свойством рецепторов различной природы. Сначала лиганд фиксируется на поверхности рецептора, затем про-

исходит его активация. Ранее мы изучали взаимодействие двухкомпонентного комплекса Tag7–Hsp70 с рецептором TNFR1 и выявили функциональную активность каждого белка. Мы показали, что Tag7 может связываться с TNFR1, но не способен вызвать агрегацию его цитоплазматических доменов, необходимую для индукции цитолиза. Hsp70, способный агрегировать в растворе, связывается с Tag7 и вызывает тримеризацию рецептора.

Не исключено, что Mts1 может связываться и с другими рецепторами на поверхности Т-лимфоцитов и НК-клеток и в комплексе с Tag7 индуцировать миграцию этих клеток. Однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение следует отметить, что в результате проведенных исследований показано, что хемотаксический комплекс Tag7–Mts1 можно считать новым лигандом хемотаксических рецепторов CCR5

и CXCR3, представленных на клетках иммунной системы. Хотя ни один из белков этого лиганда не имеет структурного мотива классического хемокина, Tag7–Mts1 может индуцировать миграцию РВМС с участием классических хемокиновых рецепторов, причем проявляет большее сродство к CCR5. Также показано, что Mts1 – один из белков двухкомпонентного комплекса, может связываться с внеклеточным доменом CCR5, однако для активации рецептора требуется дополнительное взаимодействие Tag7 с его внеклеточным участком. Понимание процессов, лежащих в основе взаимодействия неклассического хемокина с классическим хемотаксическим рецептором, будет способствовать пониманию механизмов миграции клеток иммунной системы к очагу поражения и поиску новых хемокинов. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 15-14-00031-П.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bryant V.L., Slade C.A. // Immunol. Cell Biol. 2015. V. 93. № 4. P. 364–371.
- Zlotnik A., Yoshie O. // Immunity. 2000. V. 12. № 2. P. 121–127.
- Miller A.F., Falke J.J. // Adv. Protein Chem. 2004. V. 68. P. 393–444.
- Bachelier F., Ben-Baruch A., Burkhardt A.M., Combadiere C., Farber J.M., Graham G.J., Horuk R., Sparre-Ulrich A.H., Locati M., Luster A.D., et al. // Pharmacol Rev. 2014. V. 66. № 1. P. 1–79.
- Jin T. // Curr. Opin. Cell Biol. 2013. V. 25. № 5. P. 532–537.
- Palomino D.C.T., Marti L.C. // Einstein (Sao Paulo). 2015. V. 13. № 3. P. 469–473.
- Rossi D., Zlotnik A. // Annu. Rev. Immunol. 2000. V. 18. P. 217–242.
- Dukhanina E.A., Lukyanova T.I., Romanova E.A., Guerriero V., Gnuchev N.V., Georgiev G.P., Yashin D.V., Sashchenko L.P. // Cell Cycle. 2015. V. 14. № 22. P. 3635–3643.
- Ambartsumian N.S., Grigorian M.S., Larsen I.F., Karlström O., Sidenius N., Rygaard J., Georgiev G., Lukanidin E. // Oncogene. 1996. V. 13. № 8. P. 1621–1630.
- Garrett S.C., Varney K.M., Weber D.J., Bresnick A.R. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 2. P. 677–680.
- Grigorian M.S., Tulchinsky E.M., Zain S., Ebraldidze A.K., Kramerov D.A., Kriajevska M.V., Georgiev G.P., Lukanidin E.M. // Gene. 1993. V. 135. № 1–2. P. 229–238.
- Tarabykina S., Griffiths T.R.L., Tulchinsky E., Mellon J.K., Bronstein I.B., Kriajevska M. // Curr. Cancer Drug Targets. 2007. V. 7. № 3. P. 217–228.
- Dukhanina E.A., Kabanova O.D., Lukyanova T.I., Shatalov Y.V., Yashin D.V., Romanova E.A., Gnuchev N.V., Galkin A.V., Georgiev G.P., Sashchenko L.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 33. P. 13963–13967.
- Kustikova O.S., Kiselev S.L., Borodulina O.R., Senin V.M., Afanas'eva A.V., Kabishev A.A. // Genetika. 1996. V. 32. № 5. P. 621–628.
- Michel T., Reichhart J.M., Hoffmann J.A., Royet J. // Nature. 2001. V. 414. № 6865. P. 756–759.
- Larin S.S., Korobko E.V., Kustikova O.S., Borodulina O.R., Raikhlin N.T., Brisgalov I.P., Georgiev G.P., Kiselev S.L. // J. Gene Med. 2004. V. 6. № 7. P. 798–808.
- Sashchenko L.P., Dukhanina E.A., Yashin D.V., Shatalov Y.V., Romanova E.A., Korobko E.V., Demin A.V., Lukyanova T.I., Kabanova O.D., Khaidukov S.V., et al. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 3. P. 2117–2124.
- Духанина Е.А., Яшин Д.В., Лукьянова Т.И., Романова Е.А., Кабанова О.Д., Шаталов Ю.В., Сащенко Л.П., Гнучев Н.В. // Докл. АН. 2007. Т. 414. № 2. С. 277–279.
- Guan R., Wang Q., Sundberg E.J., Mariuzza R.A. // J. Mol. Biol. 2005. V. 347. № 4. P. 683–691.
- Sashchenko L.P., Gnuchev N.V., Lukjanova T.I., Redchenko I.V., Kabanova O.D., Lukanidin E.M., Blishchenko E.Y., Satpaev D.K., Khaidukov S.V., Chertov O.Y. // Immunol. Lett. 1993. V. 37. № 2–3. P. 153–157.
- Ren M., Guo Q., Guo L., Lenz M., Qian F., Koenen R.R., Xu H., Schilling A.B., Weber C., Ye R.D., et al. // EMBO J. 2010. V. 29. № 23. P. 3952–3966.
- Gingras A.R., Basran J., Prescott A., Kriajevska M., Bagshaw C.R., Barsukov I.L. // FEBS Lett. 2008. V. 582. P. 1651–1656.
- González-Martin A., Mira E., Mañes S. // Anticancer Agents Med. Chem. 2012. V. 12. № 9. P. 1045–1057.
- Yashin D.V., Ivanova O.K., Soshnikova N.V., Sheludchenkov A.A., Romanova E.A., Dukhanina E.A., Tonevitsky A.G., Gnuchev N.V., Gabibov A.G., Georgiev G.P., et al. // J. Biol. Chem. 2015. V. 290. № 35. P. 21724–21731.
- Blanpain C., Doranz B.J., Bondue A., Govaerts C., Leener A.D., Vassart G., Doms R.W., Proudfoot A., Parmentier M.J. // Biol. Chem. 2003. V. 278. № 7. P. 5179–5187.