

Spata2L ПОДАВЛЯЕТ TLR4-ОПОСРЕДОВАННЫЙ СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ, СПОСОБСТВУЯ ДЕУБИКВИТИНИРОВАНИЮ TRAF6 И TAK1 ПРИ УЧАСТИИ CYLD

© 2022 Z. Zhang^{1,2#}, S. Zhang^{1,2#}, X. Jiang^{1,2#}, D. Wu^{1,2}, Y. Du³, X.-D. Yang^{1,2,4,5*}

¹ Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China; e-mail: xdyang@shsmu.edu.cn

² Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China

³ Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China

⁴ The Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanghai Institute of Infectious Diseases and Biosecurity, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 201203 Shanghai, China

⁵ Center for Traditional Chinese Medicine and Immunology Research, School of Basic Medical Sciences, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 201203 Shanghai, China

Поступила в редакцию 02.02.2022

После доработки 13.07.2022

Принята к публикации 15.08.2022

Toll-подобный рецептор 4 (TLR4, Toll-like receptor) представляет собой ключевой рецептор распознавания паттерна (key pattern recognition), который может быть активирован бактериальным липополисахаридом (LPS) и вызвать воспалительный ответ. Для защиты организма от микробных инфекций необходима активация TLR4. Однако в связи с тем, что гиперактивация TLR4 также приводит к отрицательным последствиям и воспалительным процессам, процесс его активации должен контролироваться механизмами отрицательной регуляции, среди которых наиболее важным может быть деубиквитинирование ключевых сигнальных молекул, происходящее при участии деубиквитинирующих ферментов (DUB, deubiquitinating enzymes). Белок CYLD является членом семейства убиквитин-специфичных процессирующих протеаз (USP, ubiquitin-specific-processing protease) этих деубиквитинирующих ферментов и действует как ключевой негативный регулятор TLR4-зависимых воспалительных ответов, вызывая отщепление полиубиквитиновых цепей от сигнальных молекул, таких как белки TRAF6 и TAK1. Нарушение регуляции активности CYLD вносит существенный вклад в возникновение состояний, ассоциированных с воспалительными процессами. Однако остаются открытыми вопросы, касающиеся регуляции активности CYLD в процессе воспалительного ответа. Недавно нами и другими авторами было показано, что белок Spata2 функционирует как важный партнёр CYLD в регуляции его ферментативной активности и связывания субстратов. В настоящей работе нами было показано, что Spata2-подобный белок Spata2L может также образовывать комплекс с белком CYLD и ингибировать TLR4-зависимый воспалительный ответ. Нами было показано, что белок Spata2L конститутивно взаимодействует с CYLD, и что дефицит белка Spata2L усиливает индуцированную LPS активацию NF-κB и экспрессию генов провоспалительных цитокинов. Конкретно, белок Spata2L усиливал CYLD-опосредованное деубиквитинирование белков TRAF6 и TAK1, вероятно, путём повышения ферментативной активности CYLD. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что белок Spata2L является впервые выявленным регулятором активности CYLD, дают новые представления о регуляторных механизмах, лежащих в основе роли CYLD в TLR4-зависимой передаче сигнала, и предполагают возможные мишени для модуляции воспалительных процессов, индуцируемых TLR-4.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: воспаление, TLR4, деубиквитинирование, CYLD, Spata2L, Spata2.

DOI: 10.31857/S032097252211015X, **EDN:** LXAZUK

Принятые сокращения: BMDM – bone-marrow-derived macrophages, макрофаги из костного мозга; KO – нокаут; LPS – липополисахарид; TLR4 – Toll-like receptor 4, Toll-подобный рецептор 4; USP – ubiquitin-specific-processing protease, убиквитин-специфичная процессирующая протеаза; WT – wild type, дикий тип.

Авторы внесли равный вклад в работу.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Воспалительные реакции, опосредованные Toll-подобными рецепторами (TLR, Toll-like receptors), необходимы для борьбы с различными инфекциями и поддержания гомеостаза тканей. Их нарушение может вызывать тяжёлые и даже летальные последствия, такие как септический шок, воспаление кишечника, аутоиммунные заболевания и рак [1–5]. Патогены или продукты их жизнедеятельности, такие как липополисахарид (LPS, lipopolysaccharide), вызывают ряд воспалительных ответов путём активации различных TLR [1, 5]. Активация TLR4 приводит к запуску процесса образования сигнального комплекса и последующего рекрутирования E3-убиквитин-лигазы TRAF6, которая катализирует полиубиквитинирование соответствующих субстратных белков и самого белка TRAF6 [6–8]. В свою очередь, это полиубиквитинирование служит в качестве платформы для рекрутирования белка TAK1 и его активации через белки TAB2 (TAK1-связывающий белок 2, TAK1-binding protein 2) и TAB3, каждый из которых связывает цепи убиквитина [6, 9]. Кроме того, прямая конъюгация цепей убиквитина с белком TAK1 вносит вклад в активацию его каталитической активности [10–14], приводя к активации нижележащих IκB-киназ (IKK, IκB kinases) и митоген-активируемых белковых киназ (MAPK, mitogen-activated protein kinases), таких как p38 и JNK [15–17]. Активированные белки IKK фосфорилируют IκBα и вызывают его деградацию в протеасомах, тем самым высвобождая фактор транскрипции NF-κB в ядро, где он индуцирует экспрессию генов провоспалительных цитокинов, таких как *IL-1β*, *IL-6* и *TNFα* [18, 19]. Активированные белки MAPK индуцируют фактор транскрипции AP-1, который принимает участие в транскрипции провоспалительных цитокинов [13, 20, 21].

Процессу активации TLR4 путём полиубиквитинирования противодействует процесс деубиквитинирования, опосредованный деубиквитинирующими белками (DUB, deubiquitinating enzymes), что необходимо для поддержания баланса силы и продолжительности воспалительного ответа. Ключевым представителем белков DUB является CYLD. Он высвобождает активирующие цепи полиубиквитина из ключевых сигнальных молекул, таких как TRAF6 и TAK1 [22, 23], тем самым ослабляя TLR4-зависимую передачу сигнала. Хорошо известно, что нарушение регуляции CYLD имеет место при различных

воспалительных процессах, включая колит, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis) и полиартрит [15, 24, 25]. До сих пор остаётся открытым вопрос о том, как регулируется ферментативная активность CYLD, и как CYLD определяет различные белковые мишени в TLR4-зависимом сигнальном пути.

Недавно, чтобы выяснить механизм регуляции активности CYLD, нами был использован метод BioID (идентификация биотина, зависимость от близости, proximity-dependent biotin identification) для проведения скрининга CYLD-связывающих белков. В результате был идентифицирован белок Spata2 как партнёр CYLD, контролирующий внутриклеточную локализацию CYLD и его взаимодействие с субстратами в процессе активации инфламмосомы NLRP3 [26]. В ряде работ других авторов было показано, что белок Spata2 взаимодействует с CYLD, стимулируя его ферментативную активность и рекрутируя CYLD на сигнальный комплекс TNF-RSC рецептора TNFα (TNFR, TNFα receptor) после стимуляции TNFα. В этом плане комплекс Spata2 и CYLD служит в качестве важного регулятора гибели клеток, индуцированной TNFα [27–31]. Однако остаётся не выясненным, как регуляторная функция белка CYLD модулируется в TLR4-зависимом сигнальном пути.

Кроме белка Spata2, нами также был идентифицирован Spata2-подобный белок, Spata2L, который сильно взаимодействовал с CYLD при проведении скрининга белков с помощью метода BioID [26]. В настоящей работе нами было показано, что белок Spata2L, так же как и Spata2, взаимодействует с белком CYLD. Однако, в отличие от белка Spata2, Spata2L играет ключевую роль в регуляции TLR4-опосредованной передачи сигнала путём CYLD-опосредованного деубиквитинирования белков TAK1 и TRAF6. В целом наши данные указывают на белок Spata2L как на ранее не охарактеризованный регулятор воспалительного ответа с участием CYLD и TLR4 и дают новые представления о механизмах регуляции активности CYLD.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мыши. Мыши с нокаутированным (KO) геном *Spata2L* были получены в Шанхайском центре модельных организмов (Shanghai Model Organisms Center, Inc.) с использованием метода CRISPR-Cas9. Вкратце, мРНК Cas9 и

направляющие РНК (gRNA), нацеленные на экзон 2 гена *Spata2L*, были интродуцированы с использованием метода электропорации в оплодотворённые яйцеклетки мышей C57BL/6J. Полученные эмбрионы были имплантированы самкам мышей с ложной беременностью. Полученные химеры были подвергнуты обратному скрещиванию с мышами линии C57BL/6J, и гетерозиготное потомство было генотипировано с помощью геномной ПЦР с использованием пары праймеров, окружающих целевой участок в направляющей РНК (прямой: GCTAAGCTGCCAAGGTCCCTAT, обратный: GTGAGACTACTTTGAGGACAGCCAT) с последующим секвенированием полученных в результате проведения ПЦР фрагментов. Мыши содержались в стерильных условиях на медицинском факультете университета имени Джяо Тона в Шанхае (Shanghai Jiao Tong University School of Medicine), и гетерозиготы были использованы для получения однопомётников дикого типа (WT, wild-type) и мышей *Spata2L* KO. Все протоколы экспериментов на мышах были одобрены комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных медицинского факультета университета имени Джяо Тона в Шанхае.

Плазмиды и трансфекция. Плазмиды, кодирующие белки Spata2 и CYLD человека, были описаны ранее [26]. Плаزمид, кодирующая белок Spata2L человека с прикрепленным V5, поступила от «GE Dharmacon» (США). Конструкция, экспрессирующая белок Spata2L человека с прикрепленным тэгом Flag, была получена в результате клонирования с использованием метода ПЦР. Плазмиды, кодирующие белки NOIP (#50015), NOIL-1 (#50016) и Sharpin (#50014) человека с тэгом Flag, были получены от «Addgene» (США). Плазмиды, содержащие белки TRAF6 и TAK1 человека, были любезно предоставлены доктором Шао-Конг Сунь (Shao-Cong Sun) из онкологического центра Андерсона, штат Мериленд (MD Anderson Cancer Center, США). При проведении трансфекции плазмид клетки НЕК293 рассевали в 6-ячеечные микропланшеты при плотности 8×10^5 клеток/ячейка. Трансфекцию проводили с использованием реагента для трансфекции Neofect transfection reagent («Neofect Biotech», Китай) в соответствии с инструкциями производителя, и через 36–48 ч после трансфекции клетки собирали для проведения последующих анализов.

Выделение макрофагов из костного мозга (BMDM, bone-marrow-derived macrophages) и их стимуляция. Клетки костного мозга были получены от мышей одного пола и возраста и далее

подвергнуты дифференцировке, как описано ранее [26]. Хорошо дифференцированные клетки BMDM были размещены в 12-ячеечной микропланшете в плотности 5×10^5 клеток на ячейку для последующей стимуляции LPS. При проведении экспериментов по экспрессии генов клетки в течение 4 ч были стимулированы добавлением 20 нг/мл LPS (L4391, «Sigma-Aldrich», США) и затем немедленно отобраны для получения препарата РНК. Для экспериментов по определению активации сигнальных путей с помощью иммуоблоттинга клетки подвергались стимулированию в течение различных периодов времени путём добавления 50 нг/мл LPS и немедленно после отбора были лизированы во льду для получения препаратов клеточного лизата.

Выделение РНК и количественная ПЦР в реальном времени (RT-qPCR). Препарат общей РНК получали с использованием набора RNeasy Mini Kit («Qiagen», США). Препарат кДНК из РНК получали с использованием набора PrimeScript RT Reagent Kit (RR037A, «TaKaRa», Япония). RT-qPCR выполнялась трижды с использованием набора SYBR Green Master Mix (A25918, «Applied Biosystems», США). Относительные показатели экспрессии каждого гена были нормализованы относительно экспрессии гена глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФД) и представлены в виде кратной индукции. Праймеры, использованные для проведения RT-qPCR, были описаны в нашей предыдущей работе [26].

Иммуоблоттинг и иммунопреципитация. Были приготовлены лизаты клеток, которые далее были фракционированы с помощью метода электрофореза в ПААГ в присутствии SDS (SDS-PAGE) и иммуоблоттинга, как было описано ранее [26], с использованием следующих антител: CYLD (sc-74435, «Santa Cruz Biotechnology», США), тубулин (изготовлены в лаборатории), V5 (MA5-15253-HRP, «Thermo Fisher Scientific», США), HA (12013819001, «Roche», Швейцария), FLAG (F1804 или F7425, «Sigma-Aldrich»), IκBα (sc-371, «Santa Cruz Biotechnology»), фосфо-IκBα (2859S, «Cell Signaling», США), p38 (9212S, «Cell Signaling»), фосфо-p38 (9215S, «Cell Signaling»), JNK (sc-474, «Santa Cruz Biotechnology») и фосфо-JNK (9251, «Cell Signaling»). Для проведения иммунопреципитации лизаты трансфицированных клеток инкубировали с агарозными шариками с прикрепленным Flag (M2, A2220, «Sigma-Aldrich») при 4 °C в течение 2 ч. Шарики промывали 3 раза буфером для лизиса клеток и кипятили в двукратном буфере для образцов, содержащем SDS и используемом для прове-

дения SDS-PAGE и иммуноблоттинга. Иммунопреципитацию белков для определения степени их убиквитинирования проводили как было описано ранее [26]. Показаны результаты всех экспериментов (по крайней мере двух независимых повторов) с использованием иммунопреципитации и иммуноблоттинга. Количественную обработку полученных изображений результатов иммуноблоттинга проводили с использованием программы ImageJ 1.8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Spata2L обладает аминокислотной последовательностью, сходной со Spata2. Ранее, в результате проведения скрининга белков, взаимодействующих с CYLD, с помощью метода BioID нами был идентифицирован белок Spata2 как новый регулятор активности CYLD. Мы также обнаружили, что Spata2L является одним из высокодостоверных совпадений в этом скрининге [26]. Белок Spata2 состоит из *N*-концевого домена PUB и *C*-концевого домена В-box, разделённых участком (а.о. 212–356), взаимодействующим с белком HOIP [29]. Бе-

лок Spata2L имеет большое сходство с белком Spata2 в *N*-концевом домене PUB и немного меньшее сходство в *C*-концевом домене В-box (рис. S1 Приложения). В то же время, в средней части белок Spata2L отличается от белка Spata2, поскольку у него отсутствует ранее идентифицированный мотив PIM следующего состава: Asp-Leu-Tyr-Thr [29] (рис. S1 Приложения), который ответственен за взаимодействие с доменом PUB белка HOIP.

Spata2L конститутивно взаимодействует с белками CYLD и HOIP (аналогично белку Spata2). С использованием совместной иммунопреципитации нами было подтверждено взаимодействие белков Spata2L и CYLD. Наблюдалось сильное взаимодействие Spata2L с CYLD, как и в случае Spata2 (рис. 1, *a*), что согласуется со сходством их *N*-концевых PUB-доменов. Интересно, что, хотя средняя часть Spata2L отличается от мотива PIM, обнаруженного в Spata2, тем не менее Spata2L также может связываться с белком HOIP (рис. 1, *b*). Было убедительно продемонстрировано, что HOIP взаимодействует с HOIL-1 и Sharpin с образованием активной E3-лигазы, обозначаемой как LUBAC [32–34]. Однако белок

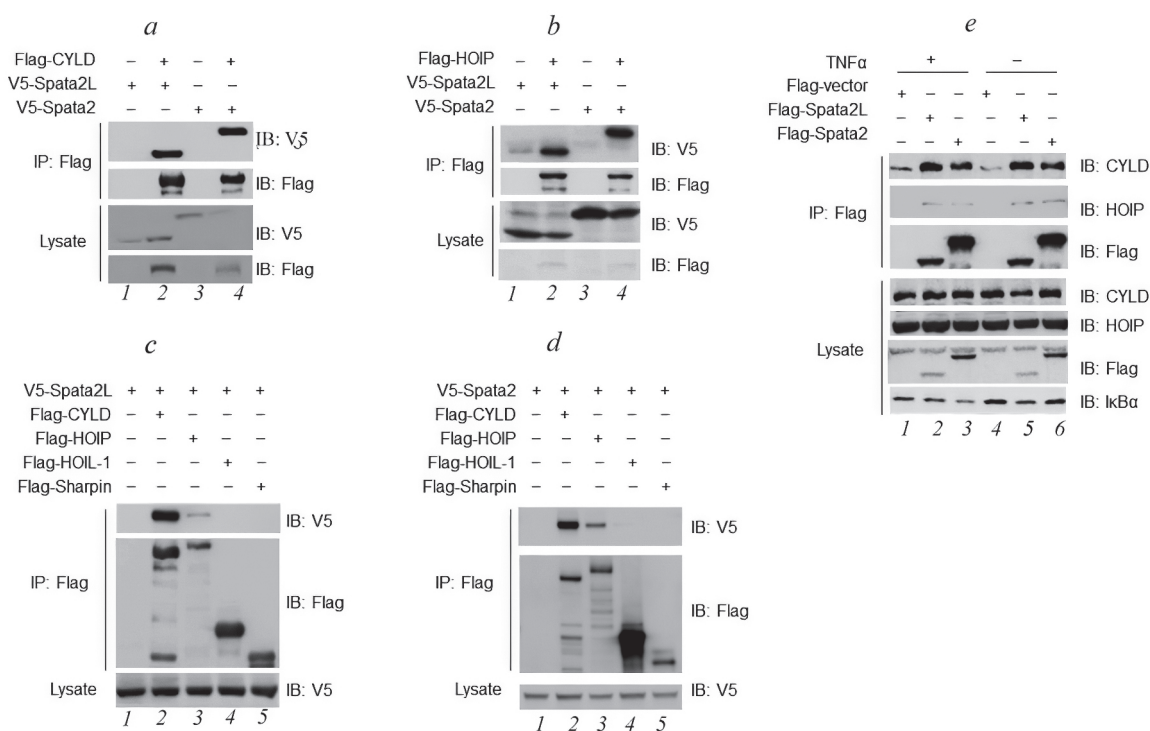


Рис. 1. Идентификация Spata2L как нового белка, взаимодействующего с CYLD. *a* и *b*) Клетки HEK293 были трансфицированы вышеупомянутыми плазмидами, и было проведено осаждение шариками с антителами против Flag (IP – иммунопреципитация). Также был проведён с использованием метода иммуноблоттинга (IB) анализ взаимодействий белка CYLD (*a*) или HOIP (*b*) с белками Spata2L и Spata2. *c*, *d*) IP-Анализ взаимодействий Spata2L (*c*) или Spata2 (*d*) с CYLD и субъединицами белка LUBAC, HOIP, HOIL-1 и Sharpin в трансфицированных клетках HEK293. *e*) IP-Анализ взаимодействий трансфицированных белков Spata2L или Spata2 с эндогенными белками CYLD или HOIP в клетках HEK293, стимулированных TNF α или не подвергшихся стимуляции. Представлены результаты экспериментов, проведённых независимо друг от друга, по крайней мере дважды. Представлены репрезентативные результаты

Spata2L не связывается с HOIP-1 или Sharpin (рис. 1, с), что указывает на высокую специфичность связывания с субъединицей HOIP из комплекса LUBAC, хотя и намного более слабого, чем с белком CYLD (рис. 1, с). Величины сродства связывания Spata2L с этими субъединицами LUBAC и белком CYLD были сходными с параметрами связывания белка Spata2 (рис. 1, d).

При проведении оценки взаимодействий белка Spata2L с эндогенными белками CYLD и HOIP при их стимуляции белком TNF α или в отсутствие такой стимуляции нами было установлено, что Spata2L взаимодействует сходным образом с эндогенными белками CYLD и HOIP как в нестимулированных клетках, так и в клетках, стимулированных белком TNF α (рис. 1, e, дорожки 2 и 5). Были выявлены конститутивные взаимодействия в парах Spata2L–CYLD и Spata2L–HOIP, напоминающие взаимодействия Spata2 с CYLD и HOIP (рис. 1, e, дорожки 3 и 6) [26, 29]. В целом данные по связыванию белков предполагают, что Spata2L и Spata2 могут иметь сходные и, вероятно, избыточные функции в регуляции процесса убиквитинирования белков с участием белков CYLD и LUBAC.

Дефицит белка Spata2L усиливал индуцированную LPS экспрессию генов провоспалительных цитокинов в первичных макрофагах. Чтобы изучить функции Spata2L *in vivo*, с помощью

системы редактирования генома CRISPR/Cas9 была получена линия мышей *Spata2L* KO, у которой делеция размером в 71 нуклеотид в экзоне 2 приводила к образованию преждевременного стоп-кодона, вызывающего терминацию трансляции на самом N-конце белка Spata2L (рис. 2, a–c). Мыши с дефицитом белка Spata2L рождались в ожидаемом менделевском соотношении, и их развитие до взрослого состояния протекало нормально. Это указывает на то, что белок Spata2L может быть необязательным для развития и роста в нормальных условиях.

Так как CYLD- и LUBAC-опосредованное убиквитинирование играет важную роль в регуляции TLR-зависимого воспалительного ответа, мы в первую очередь провели оценку LPS-индуцированной транскрипции провоспалительных цитокинов в первичных клетках BMDM, выделенных из мышей линии *Spata2L* KO и контрольных мышей WT из одного помёта. После стимуляции LPS в клетках WT происходило значительное повышение уровня мРНК провоспалительных цитокинов, включая IL-1 β , IL-6, IL-12 и TNF α . Интересно, что дефицит Spata2L в значительной степени усиливал индукцию этих цитокиновых генов (рис. 2, d).

Дефицит белка Spata2L усиливал LPS-индуцированную активацию NF- κ B в первичных макрофагах. Чтобы оценить влияние дефицита

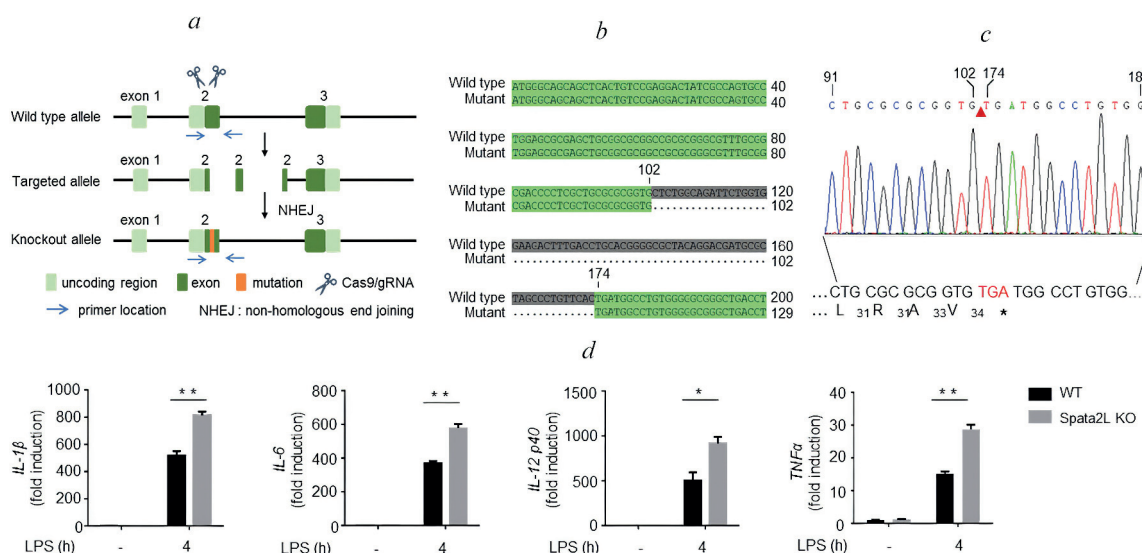


Рис. 2. Дефицит белка Spata2L усиливал экспрессию генов провоспалительных цитокинов, индуцированную LPS. a – Схематичное представление стратегии получения линии мышей *Spata2L* KO с использованием метода CRISPR/Cas9. b, c – Анализ мутантных мышей *Spata2L* KO. Выравнивание последовательностей продуктов ПЦР, амплифицированных из геномной ДНК, выделенной из мышей WT и гомозиготных мутантных мышей, показывает делецию 71 нуклеотида в мутантном аллеле (b). c – Результаты секвенирования и предсказанной трансляции мутантного аллеля; красный треугольник указывает положение делеции. d – BMDM-клетки WT и *Spata2L* KO либо не обрабатывались LPS, либо были стимулированы LPS в течение 4 ч, и транскрипция провоспалительных цитокинов была проанализирована с помощью метода RT-qPCR. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ при непарном двухвыборочном *t*-критерии Стьюдента

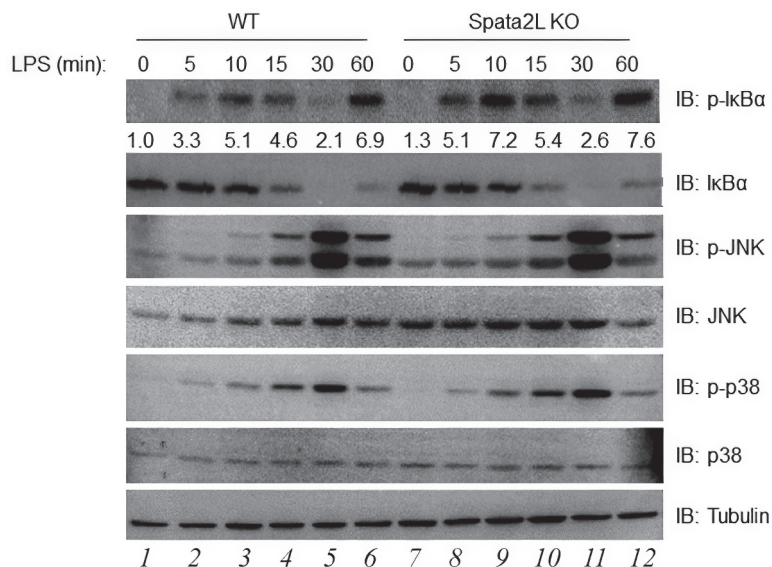


Рис. 3. Белок Spata2L имеет решающее значение для LPS-индуцированной активации NF-κB. Клетки BMDM, выделенные из мышей WT и линии *Spata2L* KO, были стимулированы LPS или не были им обработаны. Далее, эти клетки были использованы для приготовления клеточных лизатов для проведения анализа с помощью иммуноблоттинга фосфорилированной (p – phosphorylated) формы и общего белка в случае IκBα, JNK и p38. Представлены репрезентативные результаты двух независимых повторных экспериментов. Внизу показаны относительные уровни сигнала p-IκBα

Spata2L на TLR4-зависимую передачу сигнала, проводили стимуляцию клеток BMDM и изучали передачу сигнала, следующую после TLR4. Утрата белка Spata2L оказывала небольшой эффект или совсем не влияла на активацию фосфорилирования белков p38 и JNK, а фосфорилирование IκBα (ингибитор NF-κB), которое является этапом индукции в процессе активации NF-κB, немного повышалось в клетках *Spata2L* KO в сравнении с клетками WT (рис. 3). Эти результаты свидетельствуют о том, что белок Spata2L подавляет активацию NF-κB в TLR4-зависимом воспалительном ответе. В то же время ранее нами было показано, что дефицит белка Spata2 оказывает небольшое влияние или вообще не влияет на TLR4-зависимую передачу сигнала и экспрессию провоспалительных цитокинов [26]. В целом можно предположить, что белки Spata2L и Spata2, несмотря на их сходство в структуре и сродстве связывания с ферментами, участвующими в убиквитинировании белков, играют разные роли в регуляции TLR4-зависимого сигнального пути (рис. S1 Приложения и рис. 1).

Spata2L способствовал CYLD-опосредованному деубиквитинированию белков TRAF6 и TAK1. Хорошо известно, что белок CYLD необходим для удаления полиубиквитиновых цепей из молекул TRAF6 и TAK, чтобы предотвратить гиперактивацию сигнальных путей, опосредованных этими белками [22, 23]. Чтобы выяснить молекулярный механизм,

с помощью которого Spata2L осуществляет негативную регуляцию TLR4-зависимого воспалительного ответа, нами была проанализирована роль Spata2L в процессе CYLD-опосредованного деубиквитинирования TRAF6 и TAK1. Прикреплённый к эпителиальному участку (epitope-tagged) убиквитин и белки TRAF6 или TAK1 были совместно экспрессированы в клетках HEK293. Далее, белки TRAF6 или TAK1 были иммунопреципитированы для проведения анализа убиквитинирования. Эктопическая экспрессия убиквитина приводила к сильному полиубиквитинированию молекул TRAF6 и TAK1 (рис. 4, дорожки 1 и 5). Как и ожидалось, при совместной экспрессии белок CYLD взаимодействовал с белками TRAF6 и TAK1 и понижал уровни их полиубиквитинирования (рис. 4, дорожки 3 и 7). Вызывает особый интерес то, что дальнейшая совместная экспрессия Spata2L не влияла на взаимодействия CYLD с TRAF6 и TAK1, но отчётливо усиливала CYLD-опосредованное деубиквитинирование этих белков (рис. 4, дорожки 4 и 8). Эти результаты позволяют предположить важную роль белка Spata2L в модуляции деубиквитирующей активности белка CYLD в отношении полиубиквитинированных белков TRAF6 и TAK1. Неудивительно, что экспрессия Spata2L в отсутствие CYLD также вызывала снижение уровня полиубиквитинирования TRAF6 и TAK1 (рис. 4, дорожки 2 и 6), вероятно, стимулируя деубиквитирующую активность эндогенного белка CYLD.

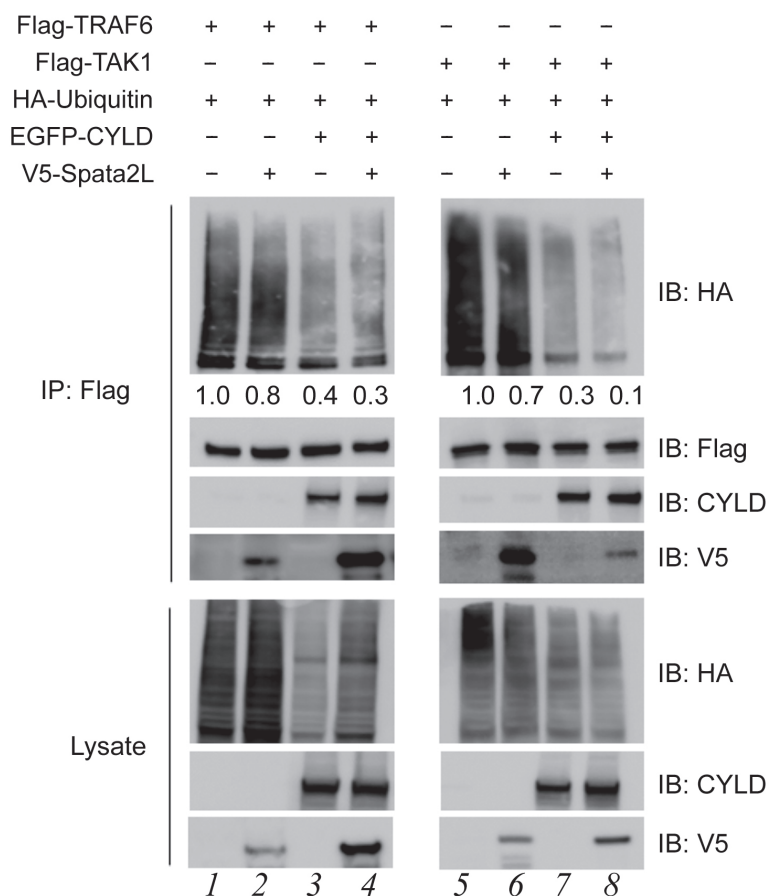


Рис. 4. Spata2L способствовал CYLD-опосредованному деубиквитинированию белков TRAF6 и TAK1. Клетки HEK293 трансфицировали вышеупомянутыми плазмидами с белками TRAF6 и TAK1 с прикреплённым Flag и затем осаждали с помощью шариков с антителами против Flag для проведения анализа степени убиквитинирования с помощью иммуноблоттинга (IB: HA) и определения их взаимодействий с белками CYLD (IB: CYLD) или Spata2L (IB: V5). Представлены результаты трёх экспериментов, выполненных независимо друг от друга. Внизу представлены относительные величины уровня сигнала убиквитинирования

Важно, что Spata2L-опосредованное повышение активности CYLD оказалось специфичным, поскольку Spata2L оказывал незначительное воздействие на процесс стабилизации репрессора транскрипции Snail белком USP37, одной из деубиквитиназ, которые мы ранее идентифицировали в качестве стабилизаторов белка Snail (рис. S2 Приложения) [35].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Белки CYLD с деубиквитиназной активностью широко признаны в качестве основных регуляторов иммунных и воспалительных ответов и возможных мишеней для действия лекарств при лечении расстройств иммунной системы и рака [36, 37]. Понимание механизма функционирования и регуляции активности белка CYLD было бы полезно для разработки лекарств для лечения заболеваний человека. В ряде работ, включая наши, Spata2L был

идентифицирован как белок, взаимодействующий с CYLD [26, 29, 38]. Однако функции белка Spata2L до сих пор оставались невыясненными. В настоящей работе нами впервые были получены свидетельства о взаимодействии этого белка с CYLD и субъединицами LUBAC и изучена его ключевая роль в модуляции TLR4-зависимого сигнального пути и воспалительных ответов через регуляцию CYLD-опосредованного деубиквитинирования белков TRAF6 и TAK1.

Как основной негативный регулятор воспалительных ответов, белок CYLD сам должен регулироваться соответствующим образом. Было показано, что активность CYLD регулируется путем посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование и убиквитинирование [22]. Появляется все больше свидетельств о том, что белок CYLD распознает некоторые из своих субстратов не напрямую, а через адапторные белки, из которых лучше всех изучен белок Spata2 [26–30]. Spata2

взаимодействует с белками CYLD и HOIP, рекрутирует CYLD на комплекс TNF–RSC и NOD2–SC в HOIP-зависимой манере и нацелен на полиубиквитинированные белки, присутствующие в этих комплексах (например, RIPK1 и RIPK2) [27–30]. Кроме того, Spata2 может выступать в качестве аллостерического активатора деубиквитирующей активности белка CYLD [29, 30].

В настоящей работе нами было показано, что подобно Spata2, белок Spata2L связывается и с CYLD, и с HOIP. Это позволяет предположить, что Spata2L также может рекрутировать CYLD на белковые комплексы TNF–RSC и NOD2–SC путём взаимодействия с белком HOIP, и, следовательно, он может быть вовлечён в TNFR- и NOD2-опосредованные пути передачи сигнала. Иными словами, белки Spata2 и Spata2L могут быть избыточными в регуляции этих сигнальных путей. Однако было обнаружено, что утрата только белка Spata2 полностью предотвращала рекрутирование белка CYLD на комплекс TNF–RSC в клетках U2OS, что указывает на то, что Spata2L может быть необязательным для этого процесса [29]. Кроме того, в нашей недавней работе было показано, что, в отличие от недостатка Spata2L, дефицит белка Spata2 не влияет на процесс активации NF-κB и экспрессию провоспалительных цитокинов в первичных BMDM. В целом эти результаты свидетельствуют против идеи о функциональной избыточности белков Spata2 и Spata2L и благоприятствуют возможности того, что эти белки выполняют различные функции в зависимости от типа клеток или соответствующего контекста. Для проверки этих предположений нужны дополнительные исследования.

В структурных исследованиях было показано, что Spata2 и OTULIN связываются с доменом PUB белка HOIP через консервативный мотив PIM, а замена в этом мотиве консервативных аминокислотных остатков приводит к значительному снижению степени связывания Spata2 с HOIP, но не сказывается на его взаимодействии с CYLD [29], что предполагает высокий уровень консервативности аминокислотной последовательности мотива PIM. Фрагмент белка в Spata2L отличается от соответствующего мотива PIM в Spata2, и в нём отсутствуют предположительно имеющие большее значение аминокислотные остатки. Тем не менее белок Spata2L связывается с HOIP так же сильно, как и Spata2. Это очевидное несоответствие указывает на то, что может потребоваться пересмотр роли консервативной последовательности PIM в различных белках.

Кроме того, сильное взаимодействие Spata2L с белком HOIP приводит к предположению о том, что Spata2L может играть роль в регуляции активности HOIP в контексте вовлечения этой E3-лигазы. Требуются дополнительные исследования физиологической и патологической значимости взаимодействия этих двух белков.

Дефицит белка Spata2L способствовал TLR4-зависимой передаче сигнала *in vitro*. Представляет интерес изучение *in vivo* функции белка Spata2L в TLR4-индуцированном воспалении с использованием мышиных моделей. Также, поскольку CYLD играет важную роль в регуляции гибели клеток, активации T- и B-клеток и противовирусном врождённом иммунитете, остаётся прояснить, вовлечён ли и Spata2L в регуляцию этих процессов [22, 24].

В заключение, наша работа открывает дверь к пониманию роли белка Spata2L в воспалительном ответе и может привлечь внимание к этой области исследований. Полученные нами результаты показывают, что белок Spata2L является ранее не охарактеризованным регулятором TLR4-зависимой передачи сигнала, предлагают новое механистическое понимание регуляции активности и функций белка CYLD и могут предложить новые потенциальные терапевтические мишени для лечения воспалительных заболеваний.

Вклад авторов. X.-D. Yang – разработка проекта; Z. Zhang и S. Zhang – проведение экспериментов; X. Jiang, D. Wu и Y. Du – участие в проведении экспериментов; Z. Zhang, X. Jiang и X.-D. Yang – анализ полученных результатов и подготовка текста статьи; X.-D. Yang – руководство проектом.

Финансирование. Эта работа была выполнена при грантовой поддержке Национальной программы ключевых исследований и разработок Китая (2021YFA1301400), Основного проекта поддержки науки и технологий муниципалитета г. Шанхай (ZD2021CY001), Национального фонда естественных наук Китая (31770818) и Шанхайской комиссии по науке и технологиям (21ZR1456300).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Были соблюдены все международные, национальные и институциональные рекомендации по уходу и использованию животных.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на английском языке на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/article/10.1134/S0006297922090085>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hennessy, E. J., Parker, A. E., and O'Neill, L. A. (2010) Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**, 293-307, doi: 10.1038/nrd3203.
- Netea, M. G., Wijmenga, C., and O'Neill, L. A. (2012) Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility, *Nat. Immunol.*, **13**, 535-542, doi: 10.1038/ni.2284.
- Murray, P. J., and Smale, S. T. (2012) Restraint of inflammatory signaling by interdependent strata of negative regulatory pathways, *Nat. Immunol.*, **13**, 916-924, doi: 10.1038/ni.2391.
- Caballero, S., and Pamer, E. G. (2015) Microbiota-mediated inflammation and antimicrobial defense in the intestine, *Annu. Rev. Immunol.*, **33**, 227-256, doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120238.
- Fitzgerald, K. A., and Kagan, J. C. (2020) Toll-like receptors and the control of immunity, *Cell*, **180**, 1044-1066, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.041.
- Chen, Z. J. (2012) Ubiquitination in signaling to and activation of IKK, *Immunol. Rev.*, **246**, 95-106, doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01108.x.
- Adhikari, A., Xu, M., and Chen, Z. J. (2007) Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK, *Oncogene*, **26**, 3214-3226, doi: 10.1038/sj.onc.1210413.
- Carpenter, S., and O'Neill, L. A. (2009) Recent insights into the structure of Toll-like receptors and post-translational modifications of their associated signalling proteins, *Biochem. J.*, **422**, 1-10, doi: 10.1042/bj20090616.
- Xia, Z. P., Sun, L., Chen, X., Pineda, G., Jiang, X., et al. (2009) Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains, *Nature*, **461**, 114-119, doi: 10.1038/nature08247.
- Reiley, W. W., Jin, W., Lee, A. J., Wright, A., Wu, X., et al. (2007) Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates the ubiquitin-dependent kinase Tak1 and prevents abnormal T cell responses, *J. Exp. Med.*, **204**, 1475-1485, doi: 10.1084/jem.20062694.
- Thiefes, A., Wolf, A., Doerrie, A., Grassl, G. A., Matsumoto, K., et al. (2006) The *Yersinia enterocolitica* effector YopP inhibits host cell signalling by inactivating the protein kinase TAK1 in the IL-1 signalling pathway, *EMBO Rep.*, **7**, 838-44, doi: 10.1038/sj.embor.7400754.
- Lamb, A., Yang, X. D., Tsang, Y. H., Li, J. D., Higashi, H., et al. (2009) Helicobacter pylori CagA activates NF-kappaB by targeting TAK1 for TRAF6-mediated Lys 63 ubiquitination, *EMBO Rep.*, **10**, 1242-1249, doi: 10.1038/embor.2009.210.
- Fan, Y., Yu, Y., Shi, Y., Sun, W., Xie, M., et al. (2010) Lysine 63-linked polyubiquitination of TAK1 at lysine 158 is required for tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-induced IKK/NF-kappaB and JNK/AP-1 activation, *J. Biol. Chem.*, **285**, 5347-5360, doi: 10.1074/jbc.M109.076976.
- Li, Q., Yan, J., Mao, A. P., Li, C., Ran, Y., et al. (2011) Tripartite motif 8 (TRIM8) modulates TNFalpha- and IL-1beta-triggered NF-kappaB activation by targeting TAK1 for K63-linked polyubiquitination, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 19341-19346, doi: 10.1073/pnas.1110946108.
- Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., and Karin, M. (1997) The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation, *Cell*, **91**, 243-252, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80406-7.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J., et al. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK, *Nature*, **412**, 346-351, doi: 10.1038/35085597.
- Israël, A. (2010) The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation, *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*, **2**, a000158, doi: 10.1101/cshperspect.a000158.
- Silverman, N., and Maniatis, T. (2001) NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity, *Genes Dev.*, **15**, 2321-42, doi: 10.1101/gad.909001.
- Kawai, T., and Akira, S. (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors, *Trends Mol. Med.*, **13**, 460-469, doi: 10.1016/j.molmed.2007.09.002.
- Yu, Y., Ge, N., Xie, M., Sun, W., Burlingame, S., et al. (2008) Phosphorylation of Thr-178 and Thr-184 in the TAK1 T-loop is required for interleukin (IL)-1-mediated optimal NFkappaB and AP-1 activation as well as IL-6 gene expression, *J. Biol. Chem.*, **283**, 24497-24505, doi: 10.1074/jbc.M802825200.
- Mao, R., Fan, Y., Mou, Y., Zhang, H., Fu, S., et al. (2011) TAK1 lysine 158 is required for TGF-beta-induced TRAF6-mediated Smad-independent IKK/NF-kappaB and JNK/AP-1 activation, *Cell. Signal.*, **23**, 222-227, doi: 10.1016/j.cellsig.2010.09.006.
- Sun, S. C. (2010) CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF-kappaB activation and diverse biological processes, *Cell Death Differ.*, **17**, 25-34, doi: 10.1038/cdd.2009.43.
- Rothschild, D. E., McDaniel, D. K., Ringel-Scaia, V. M., and Allen, I. C. (2018) Modulating inflammation through the negative regulation of NF-kappaB signaling, *J. Leukoc. Biol.*, doi: 10.1002/jlb.3mir0817-346rrr.
- Lork, M., Verhelst, K., and Beyaert, R. (2017) CYLD, A20 and OTULIN deubiquitinases in NF-kappaB signaling and cell death: so similar, yet so different, *Cell Death Differ.*, **24**, 1172-1183, doi: 10.1038/cdd.2017.46.
- Mathis, B. J., Lai, Y., Qu, C., Janicki, J. S., and Cui, T. (2015) CYLD-mediated signaling and diseases, *Curr. Drug Target*, **16**, 284-294, doi: 10.2174/1389450115666141024152421.
- Yang, X. D., Li, W., Zhang, S., Wu, D., Jiang, X., et al. (2020) PLK4 deubiquitination by Spata2-CYLD suppresses NEK7-mediated NLRP3 inflammasome

- activation at the centrosome, *EMBO J.*, **39**, e102201, doi: 10.15252/embj.2019102201.
27. Kupka, S., De Miguel, D., Draber, P., Martino, L., Surinova, S., et al. (2016) SPATA2-mediated binding of CYLD to HOIP enables CYLD recruitment to signaling complexes, *Cell Rep.*, **16**, 2271-80, doi: 10.1016/j.celrep.
 28. Wagner, S. A., Satpathy, S., Beli, P., and Choudhary, C. (2016) SPATA2 links CYLD to the TNF- α receptor signaling complex and modulates the receptor signaling outcomes, *EMBO J.*, **35**, 1868-1884, doi: 10.15252/embj.201694300.
 29. Elliott, P. R., Leske, D., Hrdinka, M., Bagola, K., Fiil, B. K., et al. (2016) SPATA2 links CYLD to LUBAC, activates CYLD, and controls LUBAC signaling, *Mol. Cell*, **63**, 990-1005, doi: 10.1016/j.molcel.2016.08.001.
 30. Schlicher, L., Wissler, M., Preiss, F., Brauns-Schubert, P., Jakob, C., et al. (2016) SPATA2 promotes CYLD activity and regulates TNF-induced NF- κ B signaling and cell death, *EMBO Rep.*, **17**, 1485-1497, doi: 10.15252/embr.201642592.
 31. Wei, R., Xu, L. W., Liu, J., Li, Y., Zhang, P., et al. (2017) SPATA2 regulates the activation of RIPK1 by modulating linear ubiquitination, *Genes Dev.*, **31**, 1162-1176, doi: 10.1101/gad.299776.117.
 32. Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., et al. (2009) Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 123-132, doi: 10.1038/ncb1821.
 33. Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., et al. (2011) SHARPIN is a component of the NF- κ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex, *Nature*, **471**, 633-636, doi: 10.1038/nature09815.
 34. Emmerich, C. H., Schmukle, A. C., and Walczak, H. (2011) The emerging role of linear ubiquitination in cell signaling, *Sci. Signal.*, **4**, re5, doi: 10.1126/scisignal.2002187.
 35. Qian, W., Li, Q., Wu, X., Li, W., Li, Q., et al. (2020) Deubiquitinase USP29 promotes gastric cancer cell migration by cooperating with phosphatase SCP1 to stabilize Snail protein, *Oncogene*, **39**, 6802-6815, doi: 10.1038/s41388-020-01471-0.
 36. Lopez-Castejon, G., and Edelmann, M. J. (2016) Deubiquitinases: novel therapeutic targets in immune surveillance, *Mediators Inflamm.*, **2016**, 3481371, doi: 10.1155/2016/3481371.
 37. Harrigan, J. A., Jacq, X., Martin, N. M., and Jackson, S. P. (2018) Deubiquitylating enzymes and drug discovery: emerging opportunities, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **17**, 57-78, doi: 10.1038/nrd.2017.152.
 38. Sowa, M. E., Bennett, E. J., Gygi, S. P., and Harper, J. W. (2009) Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape, *Cell*, **138**, 389-403, doi: 10.1016/j.cell.2009.04.042.

Spata2L SUPPRESSES TLR4 SIGNALING BY PROMOTING CYLD-MEDIATED DEUBIQUITINATION OF TRAF6 AND TAK1

Z. Zhang^{1,2#}, S. Zhang^{1,2#}, X. Jiang^{1,2#}, D. Wu^{1,2}, Y. Du³, and X.-D. Yang^{1,2,4,5*}

¹Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China; e-mail: xdyang@shsmu.edu.cn

²Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China

³Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China

⁴The Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanghai Institute of Infectious Diseases and Biosecurity, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 201203 Shanghai, China

⁵Center for Traditional Chinese Medicine and Immunology Research, School of Basic Medical Sciences, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 201203 Shanghai, China

Toll-like receptor 4 (TLR4) is a key pattern recognition receptor that can be activated by bacterial lipopolysaccharide to elicit inflammatory response. Proper activation of TLR4 is critical for the host defense against microbial infections. Since overactivation of TLR4 causes deleterious effects and inflammatory diseases, its activation needs to be tightly controlled by negative regulatory mechanisms, among which the most pivotal could be deubiquitination of key signaling molecules mediated by deubiquitinating enzymes (DUBs). CYLD is a member of the USP family of DUBs that acts as a critical negative regulator of TLR4-dependent inflammatory responses by deconjugating polyubiquitin chains from signaling molecules, such as TRAF6 and TAK1. Dysregulation of CYLD is implicated in inflammatory diseases. However, how the function of CYLD is regulated during inflammatory response remains largely unclear. Recently, we and other authors have shown that Spata2 functions as an important CYLD partner to regulate enzymatic activity of CYLD and substrate binding by this protein. Here, we show that a Spata2-like protein, Spata2L, can also form a complex with CYLD to inhibit the TLR4-dependent inflammatory response. We found that Spata2L constitutively interacts with

CYLD and that the deficiency of Spata2L enhances the LPS-induced NF- κ B activation and proinflammatory cytokine gene expression. Mechanistically, Spata2L potentiated CYLD-mediated deubiquitination of TRAF6 and TAK1 likely by promoting CYLD enzymatic activity. These findings identify Spata2L as a novel CYLD regulator, provide new insights into regulatory mechanisms underlying CYLD role in TLR4 signaling, and suggest potential targets for modulating TLR4-induced inflammation.

Keywords: inflammation, TLR4, deubiquitination, CYLD, Spata2L, Spata2