

УДК 577.21

КОМПЛЕКС TAG7-MTS1 ВЫЗЫВАЕТ ХЕМОТАКСИС РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

© 2022 г. О. К. Иванова^{1,*}, Т. Н. Шарапова¹, Е. А. Романова¹, Л. П. Сащенко¹, Д. В. Яшин¹, академик РАН Г. П. Георгиев¹

Поступило 22.05.2022 г.
После доработки 02.06.2022 г.
Принято к публикации 10.06.2022 г.

Одним из фундаментальных свойств иммунной системы является способность сохранять баланс между активацией и подавлением эффекторных свойств лимфоцитов. Ключевую роль в этом процессе играет субпопуляция регуляторных Т-лимфоцитов. Нарушение их функциональной активности лежит в основе многих онкологических и аутоиммунных заболеваний, и поэтому изучение их свойств чрезвычайно важно для разработки новых терапевтических подходов. В данной работе мы показали, что регуляторные Т-лимфоциты способны мигрировать по градиенту концентрации комплекса Tag7–Mts1, а также вырабатывать вещества, вызывающие миграцию клеток крови.

Ключевые слова: регуляторные Т-лимфоциты, хемотаксис, Tag7, Mts-1

DOI: 10.31857/S2686738922050110

В 1996 г. в нашем институте был описан ген нового белка Tag7 (также известного как пептидогликан-распознающий белок 1 PGLYRP1 или PGRP-S) [1]. Он принадлежит к консервативному семейству белков, обнаруженных у различных организмов от насекомых до млекопитающих. Данные белки распознают уникальный компонент клеточной стенки бактерий – пептидогликан [2]. Было показано, что у насекомых Tag7 участвует в антибактериальной защите организма посредством активации Toll-рецепторов [3]. У млекопитающих данный белок является компонентом врожденного иммунитета, участвует в фагоцитозе нейтрофилов [4], а также в комплексе с белком теплового шока Hsp70 активирует Т-лимфоциты и играет важную роль в противоопухолевой защите [5].

Помимо Hsp70, Tag7 способен связываться с Ca²⁺-связывающим белком метастазин-1 (Mts1 или S100A4). Наиболее изученной функцией Mts1 является участие в метастазировании опухолевых клеток [6], однако, он экспрессируется и в нормальных клетках организма, включая фибробласты, лимфоциты и макрофаги. В нашей лаборатории было показано, что комплекс Tag7–Mts1 способен вызывать направленную мигра-

цию лимфоцитов человека по градиенту концентрации (хемотаксис) [7]. Этот процесс играет важную роль в развитии иммунного ответа, воспалительных реакций, а также в патогенезе инфекционных и онкологических заболеваний.

Одной из субпопуляций лимфоцитов, осуществляющих координацию иммунного ответа, являются регуляторные Т-клетки (Treg). Основная их функция заключается в подавлении аутоиммунных реакций. Нарушение баланса созревания и активации этих клеток лежит в основе патогенеза таких болезней, как ревматоидный артрит, псориаз и системная красная волчанка [8]. Впервые регуляторные Т-клетки были описаны как лимфоциты с фенотипом CD4⁺CD25⁺, подавляющие развитие аутоиммунных заболеваний у мышей [9]. Позже было обнаружено, что для нормального созревания и функционирования Т-регуляторным лимфоцитам необходим транскрипционный фактор FoxP3. Он обеспечивает их супрессивные свойства, стимулируя экспрессию генов *IL2Ra*, *CTLA4* и *TNFRsf18*. Также FoxP3 подавляет экспрессию эффекторных цитокинов, в т.ч. IL4, IFN γ , и активность циклической нуклеотидной фосфодиэстеразы 3B (PDE3B), поддерживая необходимый гомеостаз в Т-регуляторных клетках [10]. Однако в экспериментах по идентификации и сортировке Treg оказалось, что среди FoxP3⁺ клеток встречаются также лимфоциты с фенотипом CD4⁺CD25⁻. Поиск более специфичных маркеров для регуляторных Т-лимфоцитов привел к открытию обратной корреляции между экс-

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: olga.k.ivanova@gmail.com

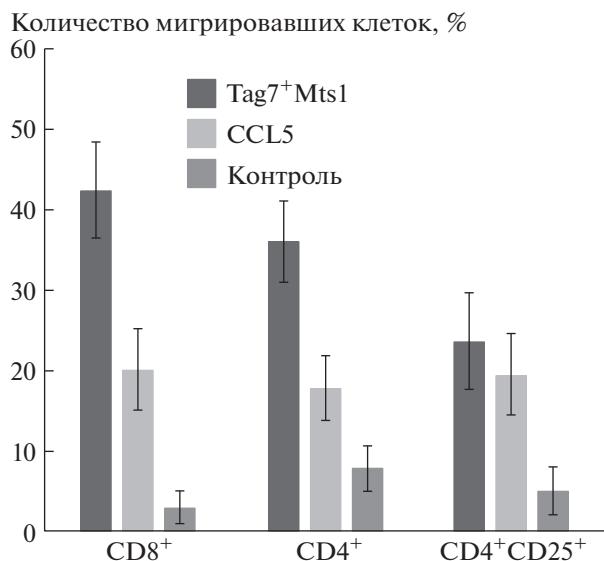


Рис. 1. CD4⁺ и CD8⁺ лимфоциты способны мигрировать по градиенту концентрации комплекса Tag7-Mts1 и CCL5.

прессией FoxP3 и рецептора IL7 (CD127). Было показано, что более 85% клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺CD127^{-(Lo)} экспрессируют FoxP3 [11]. При проверке супрессивных свойств клетки CD4⁺CD25⁺CD127⁻ продемонстрировали свою высокую эффективность [12]. Таким образом, использование указанных трех маркеров позволяет с точностью более 85% идентифицировать регуляторные Т-лимфоциты в периферической крови методом проточной цитофлуориметрии. Изучение свойств Treg клеток представляет большой интерес в свете новых данных об их участии в противоопухолевом иммунном ответе, заживлении ран, аллергии на пищу и других процессах организма.

Целью данной работы было исследовать способность регуляторных Т-клеток к хемотаксису по градиенту концентрации комплекса Tag7-Mts1, а также выяснить, выделяют ли они данный комплекс в среду инкубации.

Лимфоциты получали из лейкомассы здоровых доноров путем центрифугирования на градиенте фикола по стандартной методике. Все доноры подписывали добровольное согласие, материал был принят в работу анонимно. CD4⁺ (рис. 1) и CD4⁺CD25⁺ (рис. 2) субпопуляции лимфоцитов выделяли с использованием наборов с магнитными шариками Dynabeads (Invitrogen, США). Хемотаксис проводили в камерах HTS Transwell (96 лунок, полиэфирная мембрана, поры 8 мкм, производство Corning, США) в среде RPMI без сыворотки при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности. В качестве хемоаттрактантов использовали комплекс Tag7-Mts1 в концентрации 10⁻⁷ М и CCL5

(R&D Systems, США) в концентрации 5 × 10⁻⁹ М. Для образования комплекса Tag7 смешивали с Mts1 в соотношении 1:2 и инкубировали 1 ч. В качестве отрицательного контроля использовали среду RPMI без сыворотки. Через 18 ч после нанесения в хемотактическую камеру подсчитывали количество клеток, оказавшихся в нижней ячейке, с использованием набора MTT (Abscam, Великобритания), а фенотип мигрировавших клеток определяли на проточном цитофлуориметре Cytoflex (Beckman Coulter Life Sciences, США). Для проточной цитофлуориметрии были использованы следующие антитела: антитела к CD8 и CD4 производства Invitrogen, США, антитела к CD25 производства Biolegend, США, антитела к CD127 производства Beckman Coulter, США. В эксперименте с кондиционированной средой (рис. 3) ингибиторные антитела к Tag7 (Invitrogen, США) и Mts1 (ThermoScientific, США) добавляли в нижнюю ячейку хемотактической камеры за час до начала инкубации общей лимфоцитарной фракции с супернатантами. Долю мигрировавших клеток для каждой из субпопуляций рассчитывали как (общее количество клеток в нижней камере × процент данной популяции по данным цитофлуориметрии) / (общее количество клеток, нанесенных в верхнюю камеру × процент данной популяции в исходной смеси клеток по данным цитофлуориметрии) × 100%. На рисунках представлены данные не менее трех независимых экспериментов как среднее ± стандартное отклонение. Для статистической обработки использовали пакет SigmaPlot (Systat Software Inc, Великобритания).

На первом этапе работы мы проанализировали способность CD4⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов к миграции по градиенту концентрации хемоаттрактивных веществ. Для этого мы провели хемотаксис общей фракции лимфоцитов и определили фенотип мигрировавших клеток с помощью проточного цитофлуориметра. Ранее в нашей лаборатории уже было показано, что комплекс Tag7-Mts1 вызывает миграцию лимфоцитов [7]. В данной работе мы в качестве хемоаттрактантов использовали как комплекс Tag7-Mts1, так и классический хемокин CCL5 в качестве положительного контроля (рис. 3). Оба использованных нами хемотактических агента индуцировали клеточную миграцию.

Было обнаружено, что значительная часть CD8⁺ клеток активно отвечала на хемоаттрактанты. Как субпопуляция CD4⁺, так и CD4⁺CD25⁺ активированные клетки также мигрировали в присутствии хемоаттрактантов интенсивнее, чем без них. Причем мы наблюдали миграцию клеток CD4⁺CD25⁺ и в ответ на CCL5, и в ответ на комплекс Tag7-Mts1.

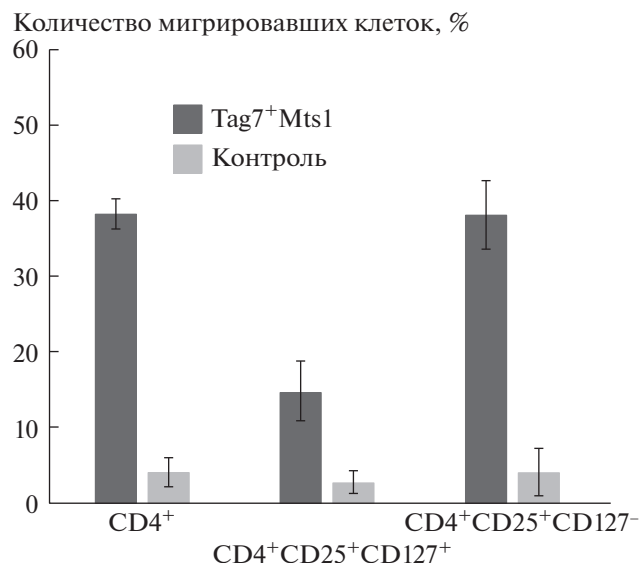


Рис. 2. CD127⁻ T-регуляторные лимфоциты более активно мигрируют в ответ на градиент концентрации комплекса Tag7-Mts1, чем субпопуляция CD127⁺.

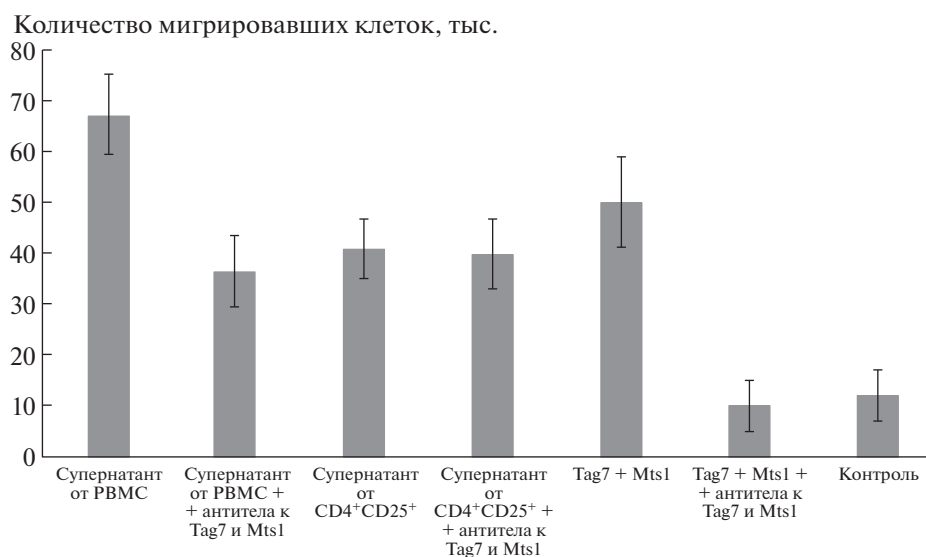


Рис. 3. Tag7 и Mts1 не играют роль хемоаттрактантов в Treg-индуцированном хемотаксисе.

Для более точной идентификации T-регуляторных лимфоцитов мы проанализировали негативный профиль экспрессии маркера CD127. Для этого мы предварительно выделяли фракцию CD4⁺ клеток с помощью магнитных шариков Dynabeads, затем наносили эти клетки в камеру Transwell и мигрировавшие клетки исследовали на проточном цитофлуориметре (рис. 2). Мы обнаружили существенную разницу в миграции клеток, экспрессирующих маркер CD127, и без него. Клетки с фенотипом CD4⁺CD25⁺CD127⁻, которые и считаются регуляторными Treg лимфо-

цитами, были значительно более активны в ответ на градиент концентрации комплекса Tag7 и Mts1, чем клетки CD127⁺. Таким образом, было показано, что регуляторные лимфоциты способны к хемотаксическому движению под действием Tag7-Mts1 комплекса.

Хорошо известно, что одной из важнейших функций CD4⁺ клеток является выработка различных веществ, воздействующих на другие клетки иммунной системы. Для того чтобы выяснить, вырабатывают ли регуляторные T-лимфоциты хе-

моаттрактанты, и, в частности, комплекс Tag7-Mts1, мы провели эксперимент с супернатантами. Была подготовлена среда, кондиционированная CD4⁺CD25⁺ клетками (как описано в [7]), и добавлена в нижнюю ячейку хемотактической камеры. В верхнюю ячейку поместили общую лейкоцитарную фракцию. Важно отметить, что никакой предварительной активации клеток проведено не было. В качестве положительного контроля была использована среда – супернатант от общей фракции мононуклеарных клеток (рис. 3). Среда, кондиционированная как общей лейкоцитарной, так и CD4⁺CD25⁺ фракцией, вызывала миграцию значительного количества лимфоцитов.

При добавлении к супернатантам ингибирующих антител к Tag7 и Mts1 активность миграции лимфоцитов снижалась в ячейках, где в качестве стимулятора выступал супернатант от общей фракции лимфоцитов, а в случае супернатанта от клеток CD4⁺CD25⁺ никаких изменений мы не обнаружили. Полученные в данном эксперименте результаты указывают на то, что CD4⁺CD25⁺ T-клетки способны вызывать хемотаксис, однако, Tag7 и Mts1 в этом процессе не участвуют. Ранее в нашей лаборатории было показано, что в среде, кондиционированной общей лейкоцитарной фракцией, присутствует комплекс Tag7-Mts1 [7]. Можно предположить, что основной вклад в экспрессию данного комплекса вносят клетки CD8⁺, а T-регуляторные клетки, по всей видимости, его в среду инкубации не выделяют.

Комплекс Tag7-Mts1 занимает особое место среди хемоаттрактантов. Он не имеет специфической для классических хемокинов третичной структуры (“греческого ключа”), однако, несмотря на это, способен активировать движение лимфоцитов. Ранее мы показали, что данный комплекс способен вызывать миграцию NK и T-клеток. Моноциты и нейтрофилы в ответ на градиент концентрации данного комплекса не проявили способности к движению [7]. В данной работе мы обнаружили, что регуляторные T-лимфоциты с фенотипом CD4⁺CD25⁺CD127⁻ способны к хемотаксическому движению по градиенту концентрации комплекса Tag7-Mts1. При этом, по всей видимости, сами регуляторные T-лимфоциты данный комплекс не экспрессируют, а вырабатывают другие молекулы с хемоаттрактивными свойствами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Геномное редактирование” Федерального государственного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук (ЦКП ИБГ РАН).

ИНФОРМАЦИЯ О КОНФЛИКТЕ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Минобрнауки России в рамках проекта (Соглашение № 075-15-2021-668 от 29.07.2021 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кустикова О.С., Киселев С.Л., Бородулина О.Р., и др. Клонирование гена Tag7, экспрессирующегося в метастазирующих опухолях мыши // Генетика. 1996. Т. 32. № 5. С. 621–628.
2. Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) // Mol. Immunol. 2004. V. 40. № 12. P. 877–886.
3. Werner T., Liu G., Kang D., et al. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 13772–13777.
4. Cho J.H., Fraser I.P., Fukase K., et al. Human peptidoglycan recognition protein S is an effector of neutrophil-mediated innate immunity // Blood. 2005. V. 106. № 7. P. 2551–2558.
5. Sashchenko L.P., Dukhanina E.A., Yashin D.V., et al. Peptidoglycan recognition protein tag7 forms a cytotoxic complex with heat shock protein 70 in solution and in lymphocytes // J. Biol. Chem. 2004. V. 9. № 279. P. 2117–2124.
6. Grigorian M., Ambartsumian N., Lykkesfeldt A.E., et al. Effect of mts1 (S100A4) expression on the progression of human breast cancer cells // Int. J. Cancer. 1996. V. 67. P. 831–841.
7. Dukhanina E.A., Lukyanova T.I., Romanova E.A., et al. A new role for PGRP-S (Tag7) in immune defense: lymphocyte migration is induced by a chemoattractant complex of Tag7 with Mts1 // Cell Cycle. 2015. V. 14. № 22. P. 3635–3643.
8. Sharma A., Rudra D. Emerging functions of regulatory T-cells in tissue homeostasis // Front. Immunol. 2018. V. 9. P. 883.
9. Asano M., Toda M., Sakaguchi N., et al. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. // J. Exp. Med. 1996 V. 184. P. 387–396.
10. Georgiev P., Charbonnier L.M., Chatila T.A. Regulatory T cells: the many faces of Foxp3. // J. Clin. Immunol. 2019. V. 39. № 7. P. 623–640.
11. Liu W., Putnam A.L., Xu-Yu Z., et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells // J. Exp. Med. 2006. V. 203. № 7. P. 1701–1711.
12. Seddiki N., Santner-Nanan B., Martinson J., et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. // J. Exp. Med. 2006 V. 203. № 7. P. 1693–700.

TAG7-MTS1 COMPLEX ACTIVATES CHEMOTAXIS OF REGULATORY T-LYMPHOCYTES

**O. K. Ivanova^{a,#}, T. N. Sharapova^a, E. A. Romanova^a, L. P. Sashchenko^a, D. V. Yashin^a,
and Academician of the RAS G. P. Georgiev^a**

^a Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: olga.k.ivanova@gmail.com

One of the basic features of immune system is the ability to sustain balance between activation and suppression of effector lymphocytes. In this process a key role belongs to the subpopulation of cells called regulatory T-lymphocytes (Treg). Many cancer and autoimmune diseases are caused by malfunctions of Treg, and investigation of this subpopulation is important for development of new therapeutic approaches. In this study we demonstrate that regulatory T-lymphocytes can migrate along the concentration gradient of Tag7-Mts1 complex, and also they produce agents that induce blood cells migration.

Keywords: regulatory T-lymphocytes, chemotaxis, Tag7, Mts1