

## АССОЦИИРОВАННЫЙ С ФОСФАТАЗОЙ CD45 ЛИМФОЦИТАРНЫЙ ФОСФОПРОТЕИН LPAP РЕГУЛИРУЕТ ЕЁ СТАБИЛЬНОСТЬ

© 2024 Н.А. Круглова<sup>1\*</sup>, Д.В. Мазуров<sup>2</sup>, А.В. Филатов<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФГБУН Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия; электронная почта: natalya.a.kruglova@yandex.ru

<sup>2</sup> ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, 115522 Москва, Россия; электронная почта: avfilat@yandex.ru

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра иммунологии, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.11.2023

После доработки 14.01.2024

Принята к публикации 16.01.2024

Ассоциированный с фосфатазой лимфоцитарный фосфопротеин (LPAP) является белком-партнёром фосфатазы CD45, однако его функция до сих пор мало изучена. Образование прочного комплекса между LPAP и CD45 позволяет предположить, что LPAP способен регулировать CD45, однако прямых биохимических подтверждений этому до сих пор не получено. Мы обнаружили, что на лимфоидных клетках Jurkat уровни белков LPAP и CD45 взаимосвязаны и коррелируют между собой. Нокаут LPAP приводит к снижению, а повышение его уровня, напротив, вызывает увеличение количества поверхностного CD45. На нелимфоидных клетках K562 такой корреляции не обнаруживалось. Мы предполагаем, что LPAP регулирует стабильность фосфатазы CD45, что, в свою очередь, способно влиять на процессы активации лимфоцитов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** LPAP, CD45, Т-клеточный рецептор, активация лимфоцитов.

DOI: 10.31857/S0320972524050118 EDN: YNXWDM

### ВВЕДЕНИЕ

Ассоциированный с фосфатазой лимфоцитарный фосфопротеин (LPAP) впервые был описан как молекула, тесно связанная с фосфатазой CD45 [1]. Белок CD45 играет важную роль в активации лимфоцитов, и он исследован довольно хорошо [2]. LPAP, в отличие от своего партнёра, изучен недостаточно полно. LPAP не имеет гомологов в протеоме человека и его функция до сих пор неизвестна. В литературе имеются лишь косвенные данные о его роли в активации Т-клеток и в развитии В-клеток [3]. Тесная связь LPAP с фосфатазой CD45 и его множественное фосфорилирование, в том числе ERK-зависимое фосфорилирование по Ser163, позволяют предположить, что этот белок – один из участников активационного каскада [4, 5]. Молекула CD45 способна регулировать киназу Lck, необходимую для запуска активационного каска-

да лимфоцитов после стимуляции Т-клеточного антигенспецифического рецептора (TCR). Взаимодействуя с CD45, LPAP может влиять на передачу сигнала от TCR лимфоцитов.

Образование прочного комплекса между LPAP и CD45 позволяет предположить, что эти белки связаны функционально. Поскольку LPAP не имеет фосфорилированных тирозинов, он не является непосредственным субстратом фосфатазы CD45, которая дефосфорилирует только модифицированные тирозины. Имеются некоторые указания на то, что LPAP препятствует образованию димеров CD45, которые характеризуются сниженной по сравнению с мономерной формой фосфатазной активностью, и, таким образом, опосредованно регулирует активность CD45 [6].

В ряде наблюдений было показано, что молекула CD45 важна для поддержания стабильности LPAP и его мышинового гомолога CD45-AP. Во-первых,

Принятые сокращения: LPAP – ассоциированный с фосфатазой лимфоцитарный фосфопротеин; mKO – моноклональная культура с нокаутом гена интереса; pKO – поликлональная культура с нокаутом гена интереса.

\* Адресат для корреспонденции.

в лимфоцитарных клеточных линиях с нокадаун фосфатазы CD45 белок LPAP синтезируется, но быстро деградирует [1]. Во-вторых, в экспериментах на линии Т-клеток с индуцируемой экспрессией CD45 установлено, что накопление белка LPAP в клетке начинается только после активации синтеза CD45 [7]. Нокадаун CD45 с помощью короткой шпилечной РНК (shRNA) снижает уровень белка LPAP [8]. Данные об обратном влиянии LPAP на CD45 ограничены и противоречивы. В лимфоцитах двух линий мышей с нокаутом LPAP уровень белка CD45 снижен [9, 10], в третьей нокаутной по LPAP линии мышей такого эффекта не наблюдалось [11], как и в клетках Jurkat с нокадаун LPAP [12].

Данные литературы указывают на то, что влияние CD45 на уровень белка LPAP осуществляется на посттранскрипционном уровне [1, 13]. Так, в клетках Jurkat WT (CD45<sup>+</sup>) и J45.01 (CD45<sup>-</sup>) детектируется высокий уровень мРНК LPAP, но белок обнаруживается только в клетках Jurkat дикого типа. При трансфекции конструкции, кодирующей CD45, в клетки J45.01 уровень белка LPAP восстанавливался [1]. Транскрипционный анализ CD45<sup>+</sup> и CD45<sup>-</sup> вариантов Т-лимфоцитов показал, что продукция мРНК LPAP и CD45 регулируется независимо друг от друга [13].

Таким образом, совокупность опубликованных данных указывает на связь между уровнями белков LPAP и CD45. Мы предположили, что LPAP для CD45 выполняет роль шаперона, который контролирует стабильность и уровень белка CD45. Для проверки этого предположения были получены клетки Jurkat, нокаутные по CD45 или по LPAP, а также серия линий с различным уровнем белка LPAP. На этих линиях показана корреляция между уровнями белков LPAP и CD45. Существование корреляции подтверждено на клональных и поликлональных популяциях. Полученные данные позволяют выдвинуть гипотезу о том, что функция LPAP состоит в регуляции экспрессии CD45 в клетке.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культивирование клеток, антитела и точная цитометрия.** Клетки линий Jurkat и K562 культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10%-ной фетальной сыворотки крупного рогатого скота, L-глутамин (4 мМ) и гентамицин (80 мг/л) (все реагенты – «ПанЭко», Россия) в увлажнённой атмосфере с 5%-ным CO<sub>2</sub> при 37 °С. Мышиные моноклональные антитела CL7 (IgG2a, анти-LPAP), LT45 (IgG2a, анти-CD45), EC101 (IgG1, анти-CD59), MC7E7 (IgG1, анти-CD98) были получены ранее в нашей лаборатории [4]. Были также использованы антитела анти-CD69-PE («BioLegend», США), ОКТЗ

(«eBioscience», США), анти-Flag M2 («Sigma-Aldrich», США).

При внутриклеточном окрашивании к осадку клеток добавляли 1 мл PBS с 1%-ным параформальдегидом и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки два раза отмывали в PBS, осадок ресуспендировали в буфере для пермеабиллизации (PBS, содержащий 0,1%-ный сапонин, 0,1%-ный БСА, 0,05%-ный NaN<sub>3</sub>). Клетки в пермеабиллизирующем буфере смешивали с антителом CL7-Alexa 594 или LT45-Alexa 594 и инкубировали 30 мин, после чего два раза отмывали в пермеабиллизирующем буфере. При поверхностном окрашивании реакцию и отмывки вели в PBS. Флуоресценцию окрашенных клеток измеряли на приборе CytoFLEX S («Beckman Coulter», США). Клетки сортировали с помощью прибора FACSaria II («Becton Dickinson Biosciences», США).

**Создание клеточных линий Jurkat с нокаутом по LPAP или CD45 с помощью CRISPR/Cas9 методом double-nicking.** Две таргетные последовательности для генов *PTPRCAP* и *PTPRC*, кодирующих LPAP и CD45 соответственно, выбирали с помощью онлайн-ресурса [www.genome-engineering.org](http://www.genome-engineering.org) [14]. Олигонуклеотиды синтезировали в компании «Евроген» (таблица).

Олигонуклеотиды отжигали и клонировали в вектор pKS-gRNA-BB по рестрикционному сайту BbsI [15, 16]. Для осуществления нокаута клетки Jurkat ( $1,5 \times 10^6$ ) трансфицировали с помощью системы для электропорации Neon («Thermo Fisher Scientific», США) по протоколу производителя. Смесь для электропорации в буфере R содержала по 0,5 мкг плазмид, кодирующих гидовые РНК gR-LPAP-1 и gR-LPAP-3 для нокаута LPAP или gRNA-CD45-1 и gRNA-CD45-2 для нокаута CD45, и 3 мкг плазмиды pCDNA3.3-Cas9 D10A (#41816, «Addgene», США). В случае нокаутирования LPAP через 24 ч после трансфекции клетки клонировали в 96-луночный планшет, через три недели тестировали на экспрессию LPAP и выбирали нокаутные клоны. В случае нокаутирования CD45 через 5 суток после трансфекции оценивали экспрессию CD45 в клетках, наращивали и сортировали популяцию, негативную по CD45.

**Создание клеточных линий Jurkat с нокаутом по LPAP методом SORTS.** Нокаутирование проводили по методу SORTS (Surface Oligopeptide knock-in for Rapid Target Selection) [17]. Кратко, принцип метода состоял в следующем. С помощью технологии CRISPR/Cas9 в ген целевого белка вставлялась короткая ДНК-конструкция (процесс, который также называется нокин), которая блокировала экспрессию эндогенного белка. При этом в клетках с нокаутом на плазматической мембране экспрессировался маркерный пептид. Наличие метки позволяло отбирать клетки с нокаутом,

Олигонуклеотиды для гидовых РНК (gRNA) *PTPRCAP* и *PTPRC*

Название	Последовательность
5'-gR-LPAP-1	CACCGCATCCCGAGCCCTAAGGTGC
3'-gR-LPAP-1	AAACGCACCTTAGGGCTCGGGATGC
5'-gR-LPAP-3	CACCGCGCTGCCACCCGAGCCCAAG
3'-gR-LPAP-3	AAACCTTGGGCTCGGGTGGCAGCGC
5'-gRNA-CD45-1	CACCGAAATGACAGCGCTTCCAGAA
3'-gRNA-CD45-1	AAACTTCTGGAAGCGCTGTCAATTC
5'-gRNA-CD45-2	CACCGAGGTGATATTACCCTCAGTC
3'-gRNA-CD45-2	AAACGACTGAGGGTAATATCACCTC
5'-2A-LPAP	<u>CGAAAGTGGTCTTGGTCACCCAGCCTGCCACACCCAGGCCACCCAGGTGCTGAGCCCTCTG-AGCCCTGCCTGTCTCCACAGGCTCTGCCTGCGGATCCGGCGCAACAAAC</u>
3'-2A-LPAP	<u>GCGGCGCCAGGCCAGTGCTAGGCCAGTGGCCAGCAGTAGGAGCAGCAGCAGCAGCAGGACAA-CGGTGACAGAGCTGGAGCCACGCTGTCTCCGCACACAAAAAACAACACAC</u>

Примечание. Последовательности плеч гомологии подчёркнуты, а жирным выделены области комплементарности к матричной плазмиде.

а использование двух меток – клетки с нокаутом по двум аллелям. С этой целью в компании «Евроген» заказывали синтез двух олигонуклеотидов с плечами гомологии: 5'-2A-LPAP и 3'-2A-LPAP (таблица).

Полученные олигонуклеотиды использовали в качестве праймеров для получения донорной ДНК. Матрицей для ПЦР служили плазмиды pUHR-mClover-AID-P2A-CD5HA2-bglpA и pUHR-mClover-AID-P2A-CD5Flag2-bglpA, предназначенные для введения в геном клеток конструкций, кодирующих пептидную метку HA или Flag соответственно [17]. ПЦР-Продукты разгоняли в 1%-ном агарозном геле, вырезали фрагмент размером около 450 п.о., который затем выделяли из геля с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (#K0692, «Thermo Fisher Scientific») по инструкции производителей. Концентрацию продуктов измеряли на приборе NanoDrop-2000 («Thermo Fisher Scientific»).

Для осуществления нокаута клетки Jurkat ( $1,5 \times 10^6$ ) трансфицировали с помощью системы для электропорации Neon, как описано выше. Смесь для электропорации в буфере R содержала по 0,5 мкг плазмид, кодирующих гидовые РНК gR-LPAP-1 и gR-LPAP-3, 3 мкг плазмиды pсDNA3.3-Cas9 D10A (#41816, «Addgene»), 0,4 мкг донорной ДНК (очищенный ПЦР-продукт, см. выше), кодирующей метку HA, и 0,7 мкг донорной ДНК, кодирующей метку Flag. Через 5 суток после трансфекции клетки тестировали на эффективность моно- и биаллельного нокина по экспрессии эпитопных тагов HA и Flag, используя проточную цитометрию. Клетки наращивали и проводили несколько

раундов сортировки позитивных популяций. Полученные клетки для простоты называли LPAP<sup>рКО</sup> (КО – нокаут, рКО – поликлональная культура с нокаутом гена интереса).

**Получение клеточных линий со стабильной экспрессией LPAP.** Клетки HEK293T сеяли по 0,1 млн на лунку 24-луночного планшета, через день культивирования проводили трансфекцию с помощью реагента Lipofectamine 2000 («Invitrogen», США). Для этого использовали три плазмиды: 0,87 мкг упаковочного вектора ВИЧ-1 pCMVΔ8.2R (#12263, «Addgene»), 1,3 мкг вектора переноса pUHR-LPAP-wt, 0,27 мкг плазмиды pCMV VSVG (#8454, «Addgene»), кодирующей белок G из вируса везикулярного стоматита. Через 6 ч меняли среду, через 48 ч отбирали супернатант и фильтровали его через 0,45-мкм фильтр. Для трансдукции клетки-мишени сеяли по 0,1 млн на лунку 24-луночного планшета и добавляли по 250 мкл супернатанта, содержащего лентивирус. Через 2 суток оценивали эффективность трансдукции с помощью проточной цитометрии. Пул трансдуцированных клеток клонировали, клоны тестировали методом проточной цитометрии.

**Активация клеток.** Клетки активировали с помощью 10 нг/мл форбол-12-миристан-13-ацетата (PMA, «Sigma-Aldrich»), культивируя в течение 4 ч. Альтернативно клетки активировали путём культивирования 24 ч в планшетах, лунки которых были предварительно покрыты анти-CD3 антителом ОКТ3 («eBioscience», США) в концентрации от 0,1 до 10 мкг/мл. Активацию останавливали путём добавления к клеткам холодного PBS.

**Иммунопреципитация (IP).** Клетки суспендировали на холоду в лизирующем буфере, содержащем 1% (*w/v*) Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, 1 mM фенилметилсульфонилфторида, 10 mM NaF и 1 mM ортованадата натрия (все реагенты – «Merck», США). После 30 мин инкубации на льду ядра и нерастворимые клеточные мембраны удаляли центрифугированием в течение 30 мин при 4 °C (20 000 *g*). IP проводили с помощью антител CL7 или LT45, ковалентно иммобилизованных на носителе AffiGel-Hz («Bio-Rad», США). Иммунопреципитаты трижды отмывали в лизирующем буфере, белок элюировали в буфере образца для SDS-PAGE (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10%-ный глицерин, 2%-ный SDS, 1%-ный 2-меркаптоэтанол и 0,05%-ный бромфеноловый синий) прогреваем в течение 5 мин при 80 °C.

**Электрофорез и Вестерн-блоттинг (WB).** Элюированные белки разделяли электрофорезом в 10- или 18%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) в восстанавливающих условиях в буферной системе Лэммли. После SDS-PAGE белки переносили на PVDF-мембрану полусухим методом. Мембрану блокировали 5%-ным сухим обезжиренным молоком в PBS с 0,1%-ным Tween-20. Антигены проявляли с помощью первичных, а затем вторичных антител против мышиного IgG, меченных пероксидазой хрена («GE Healthcare», США). Сигнал детектировали на приборе ChemiDoc XRS («Bio-Rad») с использованием реагентов для хемилюминесценции фирмы «Millipore» (США).

**Статистическая обработка данных.** Для статистического анализа и визуализации данных использовали программу GraphPad Prism 8 («GraphPad Software», США). Данные сравнивались с помощью одновыборочного *t*-критерия. На рисунках приведены средние значения ± стандартное отклонение (SD). Корреляцию оценивали с использованием непараметрического критерия Спирмена.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

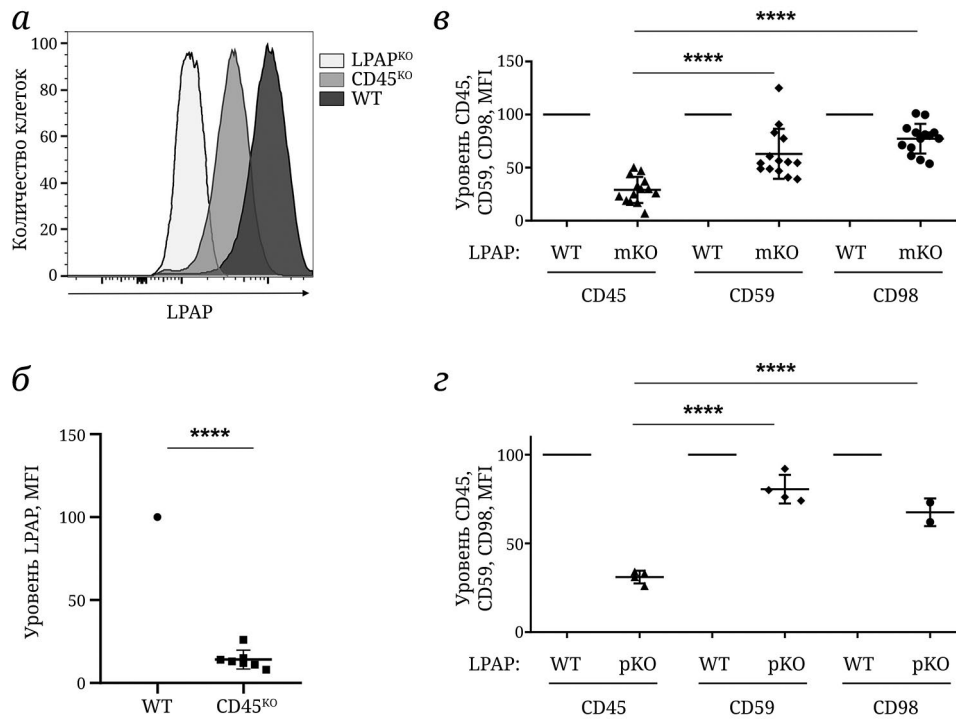
**Уровень белков LPAP и CD45 падает в отсутствии белка-партнёра.** Ранее было обнаружено, что в отсутствие фосфатазы CD45 уровень LPAP в клетке падает [1]. В то же время данные об обратном влиянии LPAP на экспрессию CD45 противоречивы. Для того чтобы оценить взаимное влияние этих двух белков, мы, используя технологию CRISPR/Cas9, получили клетки Jurkat, нокаутные по CD45 или LPAP.

Мы обнаружили, что в Т-клеточной линии Jurkat, нокаутной по CD45, уровень LPAP составлял лишь 10% от количества белка на родительской

линии, что соответствовало уровню аутофлуоресценции клеток дикого типа (рис. 1, а, б). Чтобы более полно изучить взаимосвязь между экспрессией LPAP и CD45, мы создали панель субклинорий Jurkat LPAP<sup>KO</sup> с помощью двух различных подходов. Во-первых, мы использовали «традиционный» способ нокаутирования гена LPAP с помощью технологии CRISPR/Cas9 и путём последующего клонирования получили серию моноклональных культур Jurkat LPAP<sup>KO</sup> (далее обозначены LPAP<sup>mKO</sup>, mKO – моноклональная культура с нокаутом гена интереса). Во-вторых, с помощью недавно разработанного метода SORTS [18] мы получили поликлональную линию Jurkat, нокаутную по гену LPAP (далее обозначена LPAP<sup>pKO</sup>). Второй подход имеет некоторые преимущества. Во-первых, клеточная линия Jurkat является гетерогенной и при работе с отдельными клонами этой линии велик риск того, что наблюдаемый фенотип обусловлен особенностями конкретного клона, а не экспериментальным воздействием. Во-вторых, было показано, что клоны могут сильно отличаться от родительской популяции и поликлональной популяции нокаут-ов, полученных методом сортировки, из-за закрепления нецелевых изменений генома [17–19].

Во всех культурах Jurkat LPAP<sup>mKO</sup> экспрессия CD45 оказалась сниженной и в среднем составила 30% от уровня дикого типа (рис. 1, в). Уровень CD45 в клетках Jurkat LPAP<sup>pKO</sup> составлял 37% от уровня CD45 в клетках дикого типа (рис. 1, г). Согласие между данными, полученными на отдельных клонах и на поликлональной популяции, позволяет исключить вклад межклональной вариабельности в наблюдаемый нами фенотип снижения уровня CD45. В контроле в качестве «посторонних» белков мы использовали молекулы CD59 и CD98, для которых отсутствуют данные об их взаимодействии с LPAP. Уровень «посторонних» белков CD59 и CD98 также снижался, но в значительно меньшей степени, чем CD45 (рис. 1, в;  $p < 0,0001$ ). Это указывает на специфичный характер снижения уровня белка CD45 при нокауте LPAP.

**Экспрессия CD45 коррелирует с уровнем белка LPAP.** Обнаружив, что нокаут LPAP приводит к падению уровня белка CD45, мы решили выяснить, способно ли восстановление в клетке уровня LPAP повысить экспрессию фосфатазы. С этой целью мы выбрали один из клонов Jurkat LPAP<sup>mKO</sup> и с помощью стабильной лентивирусной трансдукции ввели в него ген, кодирующий LPAP<sup>WT</sup> (LPAP дикого типа). Затем полученную популяцию клонировали и эффект восстановления экспрессии белков LPAP и CD45 оценили с помощью проточной цитометрии. При тестировании 21 субклона Jurkat мы обнаружили высокий уровень корреляции между экспрессией CD45 и LPAP (коэффициент корреляции Спирмена  $r = 0,77$ ,  $p < 0,0001$ ) (рис. 2, а).



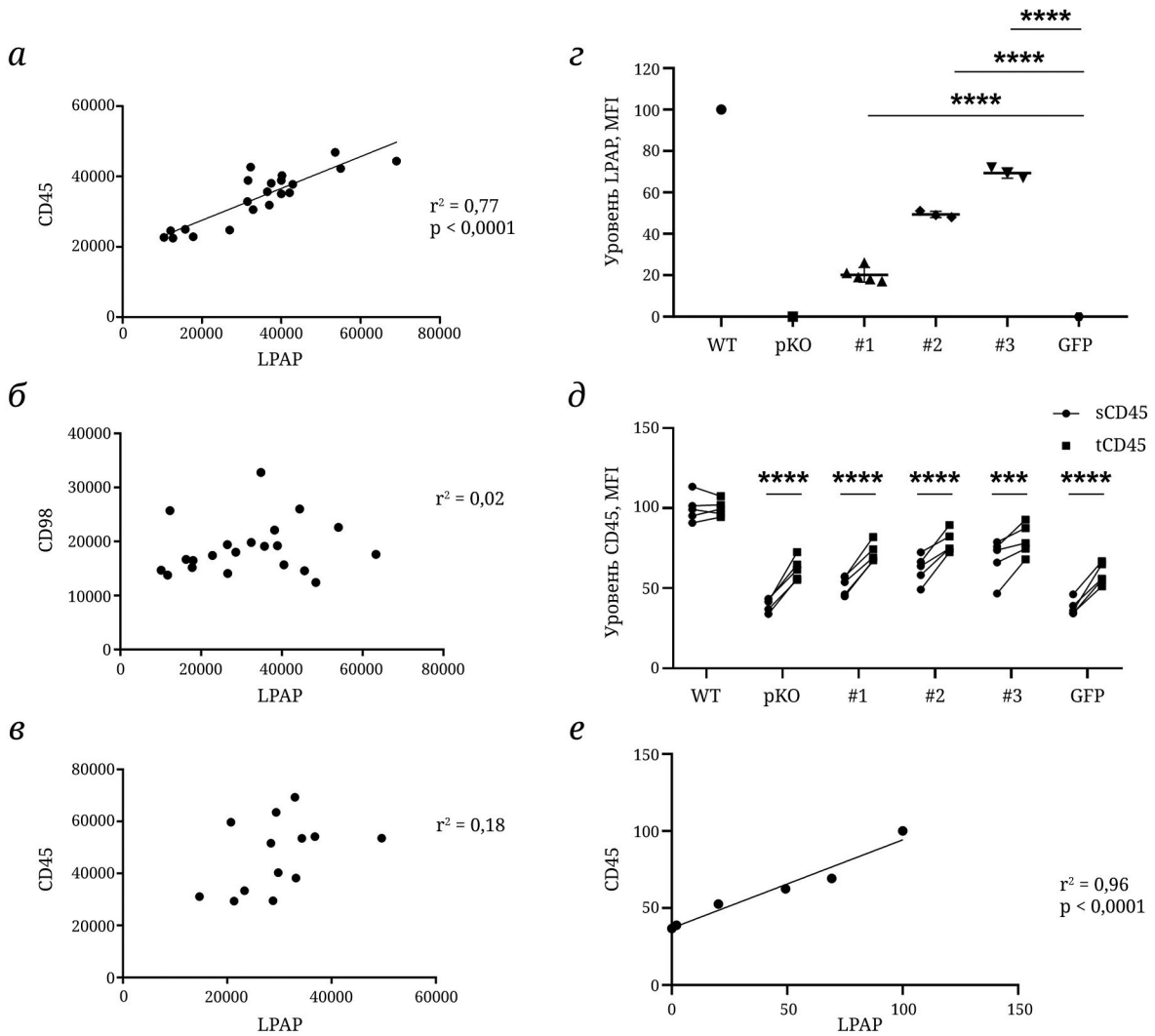
**Рис. 1.** Уровень белков LPAP и CD45 падает в отсутствии белка-партнёра. *а* – Репрезентативные цитограммы экспрессии LPAP на клетках Jurkat дикого типа (WT), а также на клетках CD45<sup>KO</sup> или LPAP<sup>KO</sup>; *б* – экспрессия LPAP по результатам тестирования 7 клонов CD45<sup>KO</sup>; *в, г* – экспрессия CD45 и «посторонних» белков CD59 и CD98 в культурах Jurkat LPAP<sup>mKO</sup> (*в*) или в LPAP<sup>pKO</sup> (*г*). Уровни экспрессии белков LPAP, CD45, CD59 и CD98 определяли с помощью проточной цитометрии. Нормализованный уровень экспрессии CD45 сравнивали с контрольным значением 100 с помощью одновыборочного *t*-критерия Стьюдента (*б*). Для сравнения уровня белков в клетках дикого типа и нокаутных использовали метод ANOVA с post hoc анализом с помощью теста Тьюки (*в, г*), \*\*\*\* *p* < 0,0001

В противоположность этому для тестируемых клонов не наблюдалось заметной корреляции между LPAP и посторонним белком CD98 ( $r = 0,02$ ) (рис. 2, б). В качестве дополнительного контроля мы использовали клоны Jurkat WT, в которых также не прослеживалась корреляция между уровнем LPAP и CD45 (рис. 2, в). Этот контроль показывает, что корреляция, проявляющаяся на рис. 2, а, не является результатом процедуры клонирования.

Поскольку описанный результат был показан на клетках, полученных из единственного клона Jurkat LPAP<sup>KO</sup>, и мог быть обусловлен особенностями случайно выбранного клона, мы решили подкрепить его с помощью данных, полученных на поликлональном нокауте. Для этого в клетки Jurkat LPAP<sup>pKO</sup> путём лентивирусной трансдукции был введён ген, кодирующий LPAP<sup>WT</sup>, или ген GFP в случае контроля. При трансдукции использовали три возрастающие дозы вируса (#1, #2, #3), после чего в полученных культурах анализировали экспрессию LPAP и CD45 с помощью проточной цитометрии. При увеличении уровня LPAP (рис. 2, г) количество CD45 в клетках также возрастало (рис. 2, д, е). Различие между уровнем поверхностного и общего CD45, наблюдаемое в клетках pKO,

не исчезало при реэкспрессии LPAP (рис. 2, д). Это свидетельствует о том, что в отсутствие LPAP происходит именно деградация CD45, а не задержка и накопление зрелой фосфатазы в везикулярной системе клетки.

**В клетках с повышенной экспрессией LPAP уровень CD45 возрастает.** На предыдущем этапе мы обнаружили корреляцию между уровнями LPAP и CD45 в клетках Jurkat, когда уровень LPAP варьировался от 0% до 100%, а уровень CD45 – от 30% до 100% в перерасчёте на их эндогенные уровни экспрессии. Закономерно возникал вопрос, сохранится ли эта корреляция при дальнейшем увеличении уровня LPAP в клетках. С помощью лентивирусной трансдукции в клетки Jurkat была введена конструкция, которая содержала кассету LPAP-Flag-IRES-GFP. После двух раундов сортировки клеток GFP<sup>hi</sup> уровень LPAP заметно увеличивался (рис. 3, а). Для того чтобы различить эндогенный LPAP и экзогенный LPAP-Flag, был проведён электрофорез в 18%-ном геле. При этом наблюдалось увеличение интенсивности полосы с повышенной молекулярной массой, которая соответствовала белку LPAP с пептидной меткой Flag, по сравнению с интенсивностью полос эндогенного LPAP (рис. 3, б).

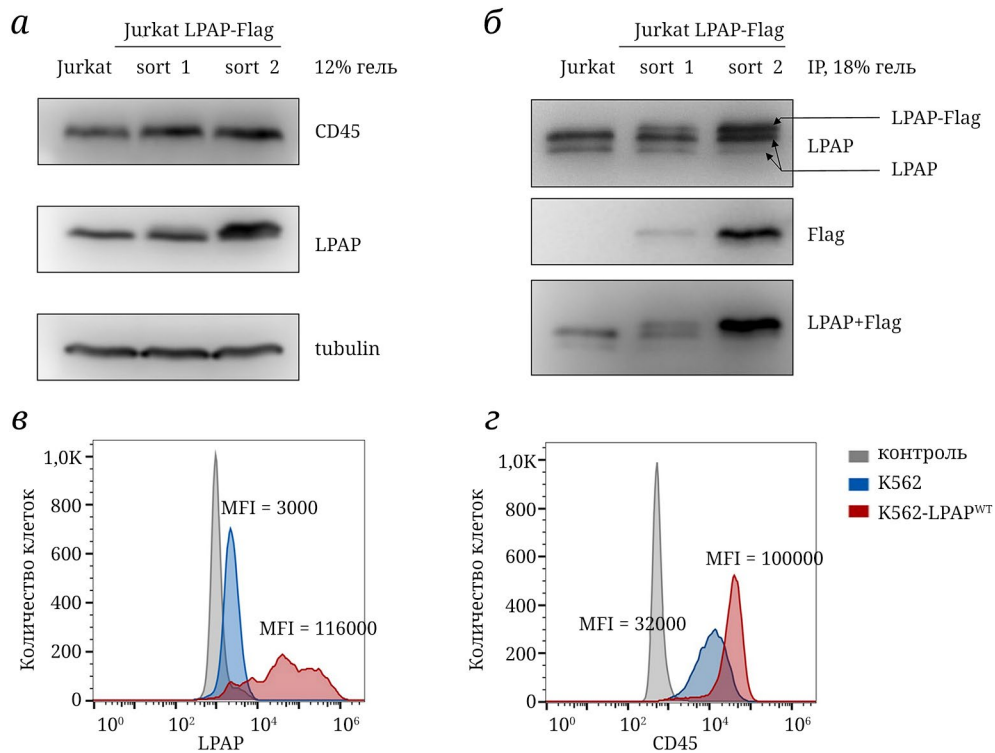


**Рис. 2.** Уровень CD45 коррелирует с уровнем белка LPAP. *а, б* – Корреляция между уровнями LPAP и CD45 (*а*) или LPAP и CD98 (*б*) в клонах Jurkat LPAP<sup>KO</sup> с реэкспрессией LPAP<sup>WT</sup>; *в* – корреляция между уровнями LPAP и CD45 в клонах Jurkat LPAP<sup>WT</sup>; *г, д* – уровень LPAP (*г*) и CD45 (*д*) на клетках Jurkat LPAP<sup>pKO</sup>, стабильно трансдуцированных возрастающей дозой вируса для реэкспрессии LPAP<sup>WT</sup> (#1, #2, #3) или экспрессии GFP. Экспрессия LPAP нормирована относительно клеточек Jurkat LPAP<sup>WT</sup>. Для CD45 показаны значения для поверхностного (sCD45) и общего (tCD45) уровня; *е* – корреляция между уровнями LPAP и CD45 в клонах Jurkat LPAP<sup>KO</sup>, стабильно трансфицированных LPAP<sup>WT</sup>. Уровни экспрессии определяли по значениям MFI, которые были нормализованы относительно среднего значения для Jurkat WT после вычитания фонового уровня в клетках Jurkat CD45<sup>KO</sup> или Jurkat LPAP<sup>KO</sup>. Приведены индивидуальные значения, а также среднее ± SD. Нормализованный уровень экспрессии LPAP в трансдуцированных клетках сравнивали со значением ноль в клетках, экспрессирующих GFP, с помощью одновыборочного *t*-критерия Стьюдента (*г*). Для сравнения уровня поверхностного (s) и общего (t) CD45 в клетках Jurkat LPAP<sup>pKO</sup> и трансдукентах использовали метод ANOVA с post hoc анализом с помощью теста Тьюки. \*\*\* *p* < 0,001, \*\*\*\* *p* < 0,0001. Средние значения для уровня LPAP и sCD45 из панели *д* использованы для расчёта корреляции (*е*)

Мы предположили, что в лимфоидных клетках Jurkat существует особый механизм гомеостатической регуляции уровня LPAP, который невозможно обойти путём лентивирусной трансдукции. С учётом этого мы обратили внимание на клетки K562 эритромиелоидной линии дифференцировки, которые несут на поверхности CD45, но практически лишены эндогенного LPAP (MFI = 3000). После лентивирусной трансдукции клетки K562 экспрессировали LPAP-Flag на высо-

ком уровне (MFI = 116 000) (рис. 3, в). Одновременно с этим в 3,1 раза возрастал и уровень белка CD45 (рис. 3, г). Таким образом, как повышение экспрессии LPAP, так и его эктопическая экспрессия приводят к увеличению экспрессии CD45.

**Нокаут LPAP снижает CD3-индуцированную экспрессию активационной молекулы CD69.** Одним из ранних проявлений активации клеток является выход на поверхность мембрану белка CD69. Для того чтобы оценить возможный вклад



**Рис. 3.** В клетках с повышенной экспрессией LPAP уровень CD45 возрастает. *а, б* – Уровень белка LPAP анализировали в клеточных линиях Jurkat и Jurkat LPAP-Flag после первой и второй сортировки (sort 1 и sort 2). Клетки лизировали (*а, б*), белок LPAP или CD45 выделяли с помощью иммунопреципитации (IP) (*б*), образцы разделяли методом электрофореза в 12%-ном (*а*) или 18%-ном (*б*) геле, проводили Вестерн-блоттинг с указанными антителами. Нижний блот (*б*) окрашивали антителами против Flag и LPAP. Формы LPAP и LPAP-Flag указаны стрелками; *в, г* – экспрессия LPAP и CD45 на поверхности клеток K562 дикого типа, а также стабильно трансдуцированных LPAP-Flag

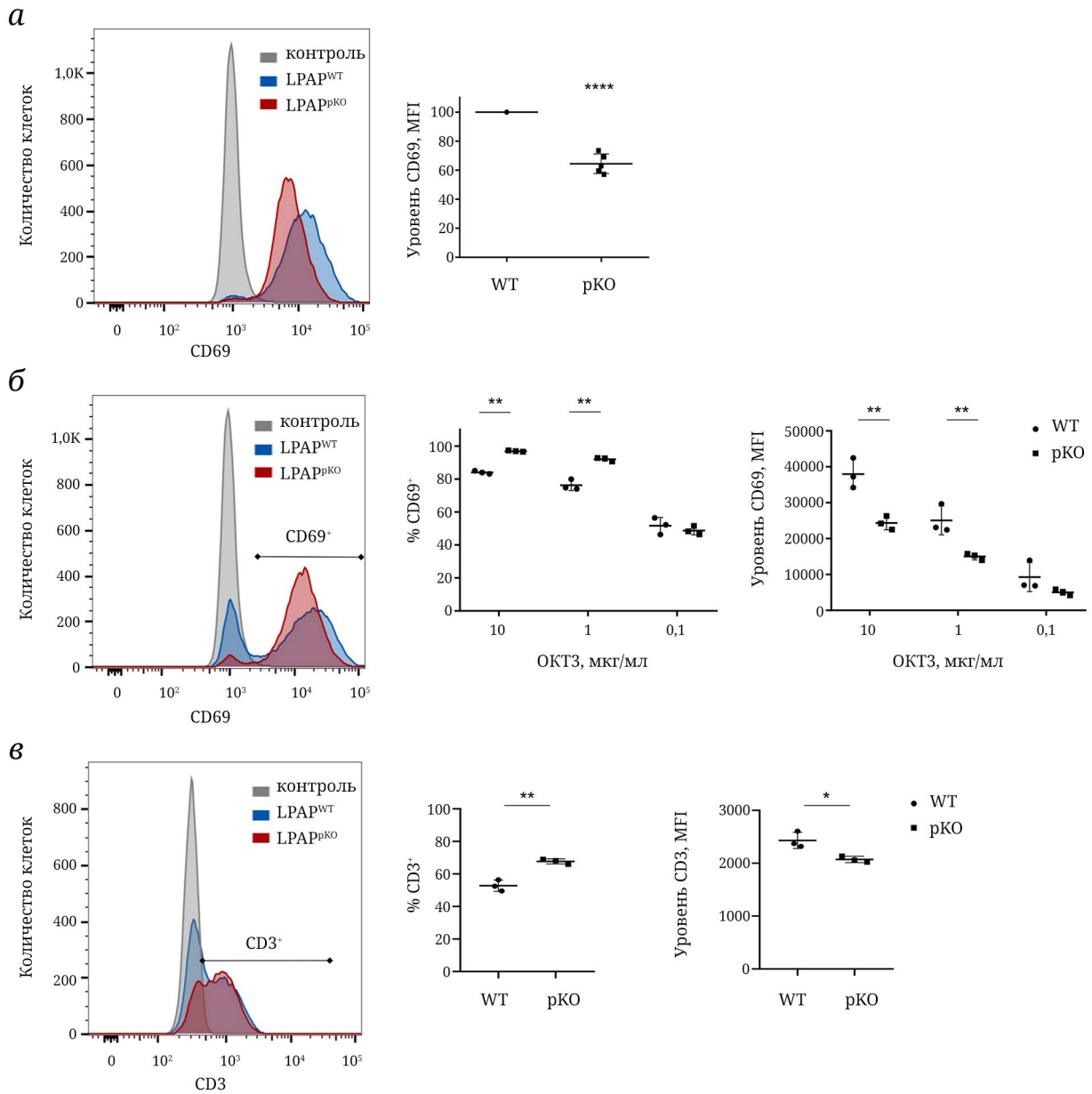
LPAP в проведение внутриклеточного сигнала, мы сравнили экспрессию молекулы CD69 на клетках Jurkat WT и Jurkat LPAP<sup>PKO</sup> при активации под действием PMA или антител против рецептора CD3. При стимуляции PMA клетки рКО экспрессировали на 40% меньше молекул CD69, чем клетки дикого типа (рис. 4, *а*). Затем мы использовали более физиологический стимул – кросс-линкование CD3 с помощью антитела ОКТ3. Поскольку экспрессия CD69 на клетках Jurkat, активированных ОКТ3, имеет бимодальное распределение (рис. 4, *б*, левая панель), мы сравнили нокаутные по LPAP клетки и клетки дикого типа по двум параметрам: проценту активированных клеток и MFI CD69<sup>+</sup> клеток из популяции с высоким уровнем CD69 (гейтирование на соответствующие популяции приведено на рис. 4, *б*, средняя и правая панели).

Клетки Jurkat характеризуются довольно низким уровнем экспрессии CD3, который детектируется только на части клеток. Мы предполагаем, что именно эти клетки отвечают на стимуляцию антителом ОКТ3, что приводит к бимодальному характеру распределения CD69. При активации через CD3 значимая разница между Jurkat WT и клетка-

ми LPAP<sup>PKO</sup> наблюдалась в образцах с высокой концентрацией ОКТ3 (10 и 1 мкг/мл). При этом в случае популяции рКО активировались практически все клетки, но уровень CD69 на них был снижен по сравнению с клетками дикого типа (рис. 4, *б*, левая панель). Эта разница могла быть связана с неодинаковым уровнем CD3 на двух типах клеток (рис. 4, *в*, левая панель). В популяции рКО процент CD3<sup>+</sup>-клеток был выше (рис. 4, *в*, средняя панель), в то время как MFI CD3<sup>+</sup>-популяции – ниже по сравнению с клетками дикого типа (рис. 4, *в*, правая панель), что соответствовало результату по экспрессии CD69.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Роль белка LPAP в клетке остаётся неизвестной, однако образование прочного комплекса с CD45 указывает на то, что функция LPAP может быть связана с регуляцией фосфатазы. Изменение статуса фосфорилирования LPAP при активации клеток позволяет предположить, что LPAP является участником сигнального каскада Т-клеточного рецептора лимфоцитов [5].



**Рис. 4.** Сравнение экспрессии молекул CD69 и CD3 на клетках Jurkat дикого типа и с нокаутом по LPAR. *а* – Экспрессия CD69 на клетках, активированных с помощью PMA; *б* – экспрессия CD69 на клетках, активированных с помощью антитела ОКТ3; *в* – экспрессия CD3 на клетках, активированных с помощью антитела ОКТ3. Уровни CD69 (*б*) и CD3 (*в*) сравнивали с помощью двухвыборочного *t*-критерия. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Некоторые исследования показывают, что фосфатаза CD45 необходима для поддержания стабильности LPAR [7, 13]. С этим хорошо согласуются полученные нами данные о том, что в клетках Jurkat, нокаутных по CD45, уровень LPAR падает на 90%. Ранее мы показали, что при нокадауне CD45 с помощью shRNA экспрессия LPAR снижалась более чем в два раза [8]. Наконец, клеточная линия J45.01, полученная на основе Jurkat и экспрессирующая лишь 5–8% CD45 по сравнению с диким типом [20], экспрессирует LPAR в три раза меньше, чем дикий тип [8]. Таким образом, имеются согласующиеся между собой данные о том, что при уменьшении

уровня CD45 количество LPAR в клетке существенно снижается.

Чтобы ответить на вопрос о возможном влиянии LPAR на уровень белка CD45, мы получили панель сублиний Jurkat, нокаутных по LPAR. Было обнаружено, что в популяции нокаутов уровень CD45 оказался сниженным до 30% от уровня дикого типа. Это наиболее выраженный эффект из всех описанных в литературе [9–11]. Можно было бы предположить, что LPAR влияет не на стабильность фосфатазы CD45, а на её локализацию. Однако наши данные о влиянии LPAR на общей и поверхностный уровень CD45 (рис. 2, *д*, *е*)



не поддерживают это предположение. Далее мы показали, что при восстановлении экспрессии LPAP уровень CD45 повышался, при этом наблюдалась корреляция между уровнями этих белков. С помощью лентивирусной трансдукции клеток Jurkat нам не удалось добиться существенного превышения уровня LPAP по сравнению с клетками дикого типа. В отличие от этого, клетки эритромиелоидной линии K562, не несущие эндогенного LPAP, были способны к стабильной гиперэкспрессии этого белка. Мы предполагаем, что в лимфоидных клетках существует жёсткий механизм, контролирующий уровень LPAP, который отсутствует в нелимфоидных клетках. Следует отметить, что на клетках Jurkat преимущественно представлена изоформа CD45RB, а на клетках K562 – изоформа CD45R0. Ранее нами было показано, что LPAP ассоциируется со всеми изоформами примерно в равной мере [8], следовательно, различное поведение LPAP на клетках Jurkat и K562 не может быть объяснено связью с различными изоформами CD45.

Данные, которые мы получили ранее, а также результаты, представленные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что фосфатаза CD45 поддерживает стабильность LPAP и влияет на его статус фосфорилирования, а белок LPAP, в свою очередь, способен регулировать уровень CD45. Стабильность белка CD45, вероятно, не полностью определяется молекулой LPAP. Это приводит к тому, что даже при полном нокауте LPAP детектируется не менее 30% белка CD45 от уровня в клетках дикого типа. Косвенные данные показывают, что LPAP может влиять на силу ответа Т-клеток на низкоаффинные лиганды [21], а также участвовать в регуляции дифференцировки В-клеток [3]. Можно предположить, что всё это происходит опосредованно, путём регуляции уровня CD45.

Группой Schraven et al. (1991) было показано, что без CD45 белок LPAP синтезируется, но быстро деградирует [7]. Можно предположить, что верно и обратное утверждение в отношении стабильности CD45. Возможно, что в отсутствие белка-партнёра в молекулах CD45 и LPAP остаются открытыми участки, ответственные за распознавание системной деградации. Баланс активности убиквитинлигаз и деубиквитинилирующих белков важен для регуляции сигнальных путей, включая каскад от Т-клеточного рецептора [22]. Например, убиквитинилирование цепей TCR под действием CBL-b необходимо для деградации рецептора и ослабления сигнального каскада на поздних этапах активации Т-клеток. Другим примером белка, чья главная функция заключается в связывании и поддержании стабильности партнёра, является трансмембранный полипептид типа 6 (СМТМ6), который взаимодействует с лигандом программируемого клеточного рецептора смерти [23].

Биоинформатический анализ предсказывает, что большая часть цитоплазматического участка LPAP не имеет выраженной структуры [24], и LPAP можно отнести к внутренне неупорядоченным белкам (intrinsically disordered protein, IDP). Такие белки могут приобретать определённую конформацию при взаимодействии с молекулой-партнёром [25]. Внутренне неупорядоченные белки благодаря своей способности взаимодействовать с различными партнёрами часто выступают в роли белков-адаптеров или белков-платформ для сборки многокомпонентных комплексов. Они могут вступать во взаимодействия с высокой специфичностью и умеренной аффинностью, что необходимо для строго регулируемых во времени процессов и делает их важными участниками сигнальных каскадов [26]. Возможно, LPAP опосредует взаимодействия CD45 с другими белками.

Вопрос о вкладе LPAP в активационный сигнальный каскад Т-лимфоцитов пока остаётся открытым. В нашей работе нокаутные по LPAP популяции Jurkat экспрессировали меньше молекул CD69 при активации с помощью PMA и ОКТ3. Исходя из этих данных, можно было бы сделать предположение о прямом влиянии LPAP на сигнальный каскад, однако такая интерпретация осложняется возможным действием LPAP опосредованно через регуляцию экспрессии CD45. Косвенным указанием на возможное участие LPAP в активации Т-лимфоцитов является наблюдение того, что сниженная экспрессия LPAP на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах является потенциальным маркером трижды негативного рака молочной железы [27].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные позволяют предположить, что основная функция LPAP сводится к модуляции уровня белка CD45. Это порождает ряд вопросов для дальнейших исследований. Каким образом взаимодействие этих двух белков поддерживает их стабильность и каков механизм деградации CD45 и LPAP в отсутствие белка-партнёра? Почему в миелоидных клетках, которые конститутивно не экспрессируют LPAP, белок CD45 стабилен? Существует ли особый механизм регуляции CD45 в лимфоидных клетках, связанный с LPAP? Ответы на эти вопросы помогут открыть новые детали активации лимфоцитов.

**Вклад авторов.** Н.А. Круглова, Д.В. Мазуров, А.В. Филатов – концепция работы; Н.А. Круглова – проведение экспериментов; Н.А. Круглова, Д.В. Мазуров, А.В. Филатов – обсуждение результатов исследования; Н.А. Круглова – написание текста;

Д.В. Мазуров, А.В. Филатов – редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-15-00289).

**Благодарности.** В работе использовали оборудование, предоставленное Центром высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины (Институт биологии

гена), развиваемым при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schraven, B., Schoenhaut, D., Bruyns, E., Koretzky, G., Eckerskorn, C., et al. (1994) LPAP, a novel 32-kDa phosphoprotein that interacts with CD45 in human lymphocytes, *J. Biol. Chem.*, **269**, 29102-29111.
- Rheinländer, A., Schraven, B., and Bommhardt, U. (2018) CD45 in human physiology and clinical medicine, *Immunol. Lett.*, **196**, 22-32, <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.009>.
- Kleiman, E., Salyakina, D., De Heusch, M., Hoek, K. L., Llanes, J. M., et al. (2015) Distinct transcriptomic features are associated with transitional and mature B-cell populations in the mouse spleen, *Front. Immunol.*, **6**, 30, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00030>.
- Kruglova, N. A., Meshkova, T. D., Kopylov, A. T., Mazurov, D. V., and Filatov, A. V. (2017) Constitutive and activation-dependent phosphorylation of lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein (LPAP), *PLoS One*, **12**, e0182468, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182468>.
- Kruglova, N., Filatov, A. (2019) T cell receptor signaling results in ERK-dependent Ser163 phosphorylation of lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **519**, 559-565, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.09.041>.
- Takeda, A., Matsuda, A., Paul, R. M. J., and Yaseen, N. R. (2004) CD45-associated protein inhibits CD45 dimerization and up-regulates its protein tyrosine phosphatase activity, *Blood*, **103**, 3440-3447, <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-2083>.
- Schraven, B., Kirchgessner, H., Gaber, B., Samstag, Y., and Meuer, S. (1991) A functional complex is formed in human T lymphocytes between the protein tyrosine phosphatase CD45, the protein tyrosine kinase p56lck and pp32, a possible common substrate, *Eur. J. Immunol.*, **21**, 2469-2477, <https://doi.org/10.1002/eji.1830211025>.
- Filatov, A., Kruglova, N., Meshkova, T., and Mazurov, D. (2015) Lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein proteoforms analyzed using monoclonal antibodies, *Clin. Transl. Immunol.*, **4**, e44, <https://doi.org/10.1038/cti.2015.22>.
- Ding, I., Bruyns, E., Li, P., Magada, D., Paskind, M., et al. (1999) Biochemical and functional analysis of mice deficient in expression of the CD45-associated phosphoprotein LPAP, *Eur. J. Immunol.*, **29**, 3956-3961, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199912\)29:12<3956::AID-IMMU3956>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199912)29:12<3956::AID-IMMU3956>3.0.CO;2-G).
- Matsuda, A., Motoya, S., Kimura, S., McInnis, R., Maizel, A. L., et al. (1998) Disruption of lymphocyte function and signaling in CD45-associated protein-null mice, *J. Exp. Med.*, **187**, 1863-1870, <https://doi.org/10.1084/jem.187.11.1863>.
- Kung, C., Okumura, M., Seavitt, J. R., Noll, M. E., White, L. S., et al. (1999) CD45-associated protein is not essential for the regulation of antigen receptor-mediated signal transduction, *Eur. J. Immunol.*, **29**, 3951-3955, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199912\)29:12<3951::AID-IMMU3951>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199912)29:12<3951::AID-IMMU3951>3.0.CO;2-9).
- Bruyns, E., Kirchgessner, H., Meuer, S., Schraven, B. (1998) Biochemical analysis of the CD45-p56(Lck) complex in Jurkat T cells lacking expression of lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein, *Int. Immunol.*, **10**, 185-194, <https://doi.org/10.1093/intimm/10.2.185>.
- Kitamura, K., Matsuda, A., Motoya, S., Takeda, A. (1997) CD45-associated protein is a lymphocyte-specific membrane protein expressed in two distinct forms, *Eur. J. Immunol.*, **27**, 383-388, <https://doi.org/10.1002/eji.1830270207>.
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., et al. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases, *Nat. Biotechnol.*, **31**, 827-832, <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9, *Science*, **339**, 823-826, <https://doi.org/10.1126/science.1232033>.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., et al. (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity, *Cell*, **154**, 1380-1389, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>.
- Zotova, A., Pichugin, A., Ateasova, A., Knyazhanskaya, E., Lopatukhina, E., et al. (2019) Isolation of gene-edited cells via knock-in of short glycoposphatidylinositol-anchored epitope tags, *Sci. Rep.*, **9**, 3132, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40219-z>.

18. Мазуров Д. В. (2020) В кн. *Методы редактирования генов и геномов* (под ред. Закияна С. М., Медведева С. П., Дементьевой Е. В., Власова В. В.) Издательство СО РАН, Новосибирск, с. 413-444.
19. Zotova, A., Lopatukhina, E., Filatov, A., Khaitov, M., and Mazurov, D. (2017) Gene editing in human lymphoid cells: role for donor DNA, type of genomic nuclease and cell selection method, *Viruses*, **9**, 325, <https://doi.org/10.3390/v9110325>.
20. Koretzky, G. A., Picus, J., Schultz, T., and Weiss, A. (1991) Tyrosine phosphatase CD45 is required for T-cell antigen receptor and CD2-mediated activation of a protein tyrosine kinase and interleukin 2 production, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2037-2041, <https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2037>.
21. Leitenberg, D., Falahati, R., Lu, D. D., and Takeda, A. (2007) CD45-associated protein promotes the response of primary CD4 T cells to low-potency T-cell receptor (TCR) stimulation and facilitates CD45 association with CD3/TCR and lck, *Immunology*, **121**, 545-554, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02602.x>.
22. Gaud, G., Lesourne, R., and Love, P. E. (2018) Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling, *Nat. Rev. Immunol.*, **18**, 485-497, <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0020-8>.
23. Burr, M. L., Sparbier, C. E., Chan, Y.-C., Williamson, J. C., Woods, K., et al. (2017) CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity, *Nature*, **549**, 101-105, <https://doi.org/10.1038/nature23643>.
24. Oates, M. E., Romero, P., Ishida, T., Ghalwash, M., Mizianty, M. J., et al. (2012) D2P2: database of disordered protein predictions, *Nucleic Acids Res.*, **41**, D508-D516, <https://doi.org/10.1093/nar/gks1226>.
25. Uversky, V. N. (2019) Intrinsically disordered proteins and their “mysterious” (meta)physics, *Front. Phys.*, **7**, <https://doi.org/10.3389/fphy.2019.00010>.
26. Wright, P. E., Dyson, H. J. (2015) Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 18-29, <https://doi.org/10.1038/nrm3920>.
27. Marchetti, P., Antonov, A., Anemona, L., Vangapandou, C., Montanaro, M., et al. (2021) New immunological potential markers for triple negative breast cancer: IL18R1, CD53, TRIM, Jaw1, LTB, PTPRCAP, *Discov. Oncol.*, **12**, 6, <https://doi.org/10.1007/s12672-021-00401-0>.

## LYMPHOCYTE PHOSPHATASE-ASSOCIATED PHOSPHOPROTEIN (LPAP) AS CD45 PROTEIN STABILITY REGULATOR

N. A. Kruglova<sup>1\*</sup>, D. V. Mazurov<sup>2</sup>, and A. V. Filatov<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine,  
Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences,  
119334 Moscow, Russia; e-mail: natalya.a.kruglova@yandex.ru

<sup>2</sup> National Research Center Institute of Immunology, Federal Medical Biological Agency of Russia,  
115522 Moscow, Russia; e-mail: avfilat@yandex.ru

<sup>3</sup> Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,  
119234 Moscow, Russia

Lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein (LPAP) is a protein of unknown function. Its close interaction with CD45 phosphatase suggests that LPAP may potentially regulate CD45, but direct biochemical evidence for this has not yet been obtained. We found that on Jurkat lymphoid cells the levels of LPAP and CD45 proteins are interrelated and well correlated with each other. Knockout of LPAP leads to a decrease, and its overexpression, on the contrary, causes an increase in the surface expression of CD45. No such correlation is found in non-lymphoid K562 cells. In the absence of LPAP, upon activation of Jurkat cells, a decrease in the expression of the activation marker CD69 was observed. This may be due to both direct and indirect effects of LPAP. We have hypothesized that LPAP is a regulator of the expression level of CD45 phosphatase.

**Keywords:** LPAP, CD45, T-cell receptor, lymphocyte activation