

УДК: 577.21

HSBP1 В КОМПЛЕКСЕ С ПЕПТИДОМ БЕЛКА ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА TAG7 СПОСОБЕН ЛИЗИРОВАТЬ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ, НЕСУЩИЕ TNFR1-РЕЦЕПТОР.

© 2024 г. Е. А. Романова, Д. М. Юркина, Д. В. Яшин*, Л. П. Сашенко,
академик РАН Г. П. Георгиев

Поступило 20.10.2023 г.

После доработки 03.11.2023 г.

Принято к публикации 03.11.2023 г.

Поиск новых цитотоксических агентов, способных лизировать опухолевые клетки, является важной задачей в борьбе с онкологическими заболеваниями. Здесь мы показали, что белок HspBP1, кошаперон белка теплового шока Hsp70, способен образовывать комплекс с ранее обнаруженным пептидом (17.1) белка врожденного иммунитета Tag7. Эксперименты с применением термофореза продемонстрировали, что сродство пептида 17.1 белка Tag7 к молекуле HspBP1 в 100 раз выше, чем у полноразмерной молекулы Tag7. Добавление комплекса 17.1-HspBP1 к опухолевым клеткам индуцирует в них апоптоз и некроптоз. Полученные в данной работе результаты могут быть использованы для разработки перспективных противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: Tag7, HspBP1, опухолевые клетки, цитотоксичность, 17.1 пептид

DOI: 10.31857/S2686738924010112, **EDN:** KQXYJX

Понимание механизмов гибели опухолевых клеток и выявление новых соединений, индуцирующих эту гибель, чрезвычайно важны для разработки новых стратегий противоопухолевой иммунотерапии.

Одним из первых цитотоксических белков был описан фактор некроза опухолей (TNF). (1) В настоящее время известно, что TNF является цитокином и играет ключевую роль в иммунном ответе. (2) Функциональная активность TNF осуществляется за счет взаимодействия с рецепторами на клеточной поверхности и индукции внутриклеточного сигнала. (3) Рецепторы TNF хорошо охарактеризованы и интенсивно исследуются. (4) Наиболее хорошо известен специфический рецептор TNF – TNFR1 (5). TNFR1 присутствует на многих тканях и клетках, в том числе и на опухолевых. Этот рецептор индуцирует в клетках два альтернативных процесса программируемой клеточной гибели: апоптоз и некроптоз. При апоптозе запускается каскад специфических протеаз – каспаз, активация которых в конечном счете приводит к расщеплению ДНК до нуклеосом (6). При блокировании каспа-

зы 8, генетическом или за счет внешних стимулов, наблюдается активация RIP1 и RIP3 фосфокиназ и включение программы некроптоза. (7)

Расширение спектра лигандов этого рецептора будет способствовать созданию новых путей иммунотерапии. Ранее нами было показано, что белок Tag7 также известный как (PGRPLY1), ген которого у мыши был обнаружен в нашем Институте (8), является лигандом TNFR1 рецептора (9). Связываясь с рецептором, он может блокировать его взаимодействие с другими лигандами, в том числе и с TNF. В комплексе с Hsp70 Tag7 индуцирует в опухолевых клетках альтернативные цитотоксические процессы (10).

Мы также описали белок, участвующий в регуляции взаимодействия Tag7-Hsp70 комплекса с клетками: HspBP1. (11) Он является ко-шапероном, регулирующим АТФазную активность Hsp70 (12). Белки могут связываться с Tag7 и ингибировать цитотоксическую активность Tag7-Hsp70 комплекса. Нами было установлено, что каждый из этих белков конкурирует с Hsp70 за центр связывания с Tag7 с образованием неактивного комплекса. Эти результаты позволяют предположить, что они связываются с тем же фрагментом Tag7, что и Hsp70. Сравнительно недавно мы выявили пептидный фрагмент Tag7 (пептид 17.1), ответ-

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской Академии Наук, Москва, Россия

*E-mail: yashin_co@mail.ru

ственный за связывание с Hsp70 и необходимый для проявления цитотоксической активности. Мы создали комплекс 17.1-Hsp70, также обладающий цитотоксическим действием на опухолевые клетки. Наши предварительные данные свидетельствуют, что Mts1 также может образовывать цитотоксический комплекс 17.1-Mts1. Здесь мы выясняли, может ли HspBP1 взаимодействовать с этим пептидом и образовывать цитотоксический комплекс.

Целью настоящей работы было: 1) сравнительная характеристика комплексов белка Tag7 и его функционального пептидного фрагмента 17.1 с белком HspBP1; 2) исследование цитотоксической активности комплекса Tag7-HspBP1 и 17.1-HspBP1.

Клетки L929 (фибробласты мыши) культивировали в среде DMEM (ПанЭко, РА) с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, США). Культура была получена из банка клеточных линий РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Для измерения цитотоксичности белки и белковые комплексы добавляли к культуре L929 в концентрации 1 нМ, если не указана другая концентрация, и инкубировали 3 ч или 20 ч. Цитотоксичность измеряли с помощью набора Cytotox (Promega, США) по методике производителя. Для ингибирования цитотоксичности использовали блокирующие антитела к TNFR1 в концентрации 10 мкг/мл (Invitrogen, США). Используются данные от 5 различных экспериментов.

Рекомбинантный белок HspBP1 был получен, как описывалось ранее. (11) Колонку с активированной CNBr сефарозой 4B (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США), конъюгированной с 17.1, изготавливали в соответствии с протоколом производителя. Белок HspBP1 наносили на эту колонку, колонку промывали PBS, содержащим 0,5 М NaCl и только PBS. Белок элюировали 0,25 М триэтиламин (TEA) при pH 12. Элюированный материал разрешали с помощью SDS-ПААГ и наносили на нитроцеллюлозную мембрану. Поликлональные кроличьи антитела к HspBP1 или Tag7 (Abcam, Кембридж, Великобритания; 1:15000; 1 ч) для детекции использовали антикроличьи антитела, связанные с HRP (Abcam, Кембридж, Великобритания; 1:15000; 1 ч). Результаты были визуализированы с использованием набора ECL Plus (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США) в соответствии с протоколом производителя. Хемилюминесценцию регистрировали с помощью прибора iBright (Thermo Fisher Scientific, Бостон, Массачусетс, США).

Очищенный HspBP1 был флуоресцентно мечен с использованием Alexa Fluor 633 (Юджин, OR, США) в соответствии с инструкциями производителя. HspBP1 (200 нМ) инкубировали в течение 20 мин с каждым соединением в темноте при комнатной температуре в 16 различных концентрациях,

полученных путем последовательного разведения, начиная с самой высокой растворимой концентрации. Образцы загружали в стеклянные капилляры (Monolith NT Capillaries) и анализировали с помощью термофореза с использованием нанотемпературного аппарата Monolith NT 115 (мощность ИК-лазера 10%). Качество сигнала контролировалось с помощью устройства NanoTemper Monolith для обнаружения возможной автофлуоресценции лиганда, осаждения, агрегации или вызванных лигандом изменений скорости фотообесцвечивания. Эксперименты были проведены в трех экземплярах и обработаны с использованием программного обеспечения для анализа сродства (MO Control v.1.6.1, Nano-Temper).

Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения Statistica 6.1 (StatSoft®). Для подтверждения нормальности распределения данных был использован тест Шапиро–Уилка. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ SD. Статистически значимые различия были

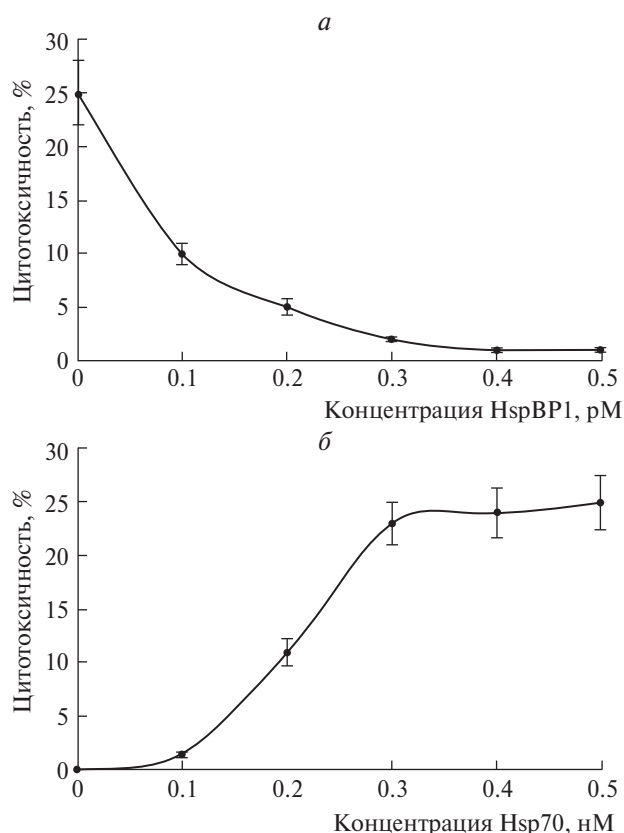


Рис. 1. (а) Добавление увеличивающейся концентрации HspBP1 к Tag7-Hsp70 комплексу ингибирует его цитотоксическую активность. (б) Добавление увеличивающейся концентрации Hsp70 к Tag7-HspBP1 комплексу приводит к появлению цитотоксической активности.

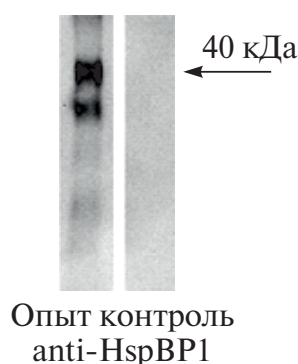


Рис. 2. Нанесение HspBP1 на 17.1-Сефарозу (опыт) или на чистую Сефарозу (контроль), разрешенный с помощью 12% SDS-ПААГ и проявленный антителами к HspBP1.

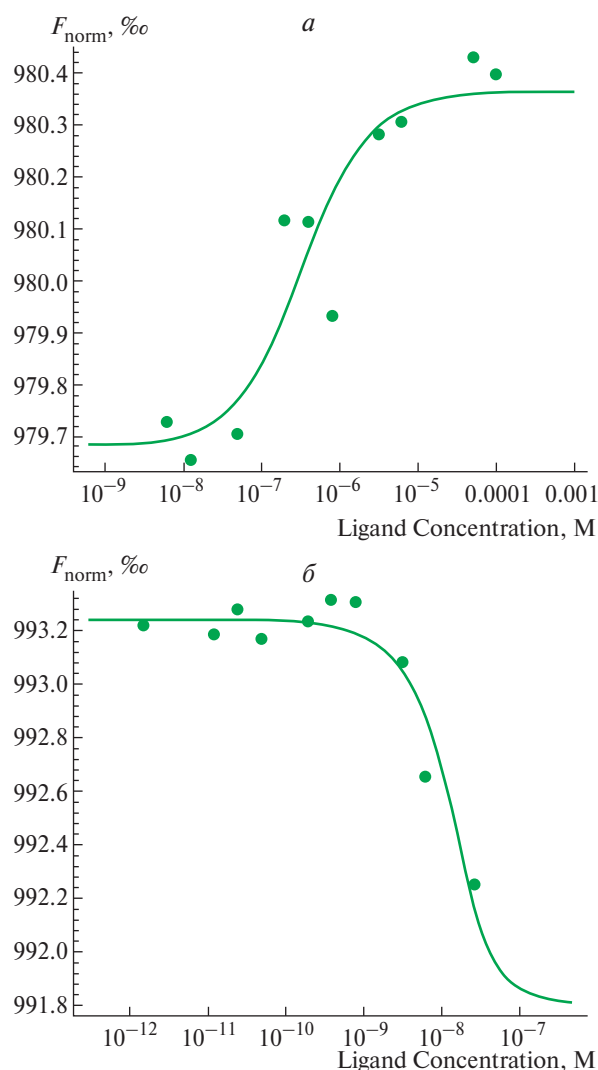


Рис. 3. Термофоретические кривые диссоциации при взаимодействии Tag7-HspBP1 (а) и 17.1-HspBP1 (б)

определены с помощью *t*-критерия. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Ранее мы показали, что HspBP1 взаимодействует с Tag7, иммобилизованным на CN-Br Сефарозе, что свидетельствует об образовании Tag7-HspBP1 комплекса. Для измерения цитотоксической активности были использованы клетки L929, так как они несут TNFR1 рецептор и высокочувствительны к действию как TNF, так и к Tag7-Hsp70 комплексу. Здесь мы подтвердили, что добавление HspBP1 ингибирует цитотоксическую активность Tag7-Hsp70 комплекса в дозозависимой. Результаты, представленные на рис. 1, а демонстрируют резкое падение цитотоксичности комплекса Tag7-Hsp70 с увеличением концентрации ингибирующего белка HspBP1. Комплекс Tag7-HspBP1 не обладает цитотоксической активностью, но добавление Hsp70 вызывает рост цитотоксической активности с увеличением концентрации Hsp70. Максимальная цитотоксичность достигается при 5-ти кратном избытке Hsp70 по отношению к Tag7-HspBP1 комплексу (рис. 1, б). Эти результаты позволяют предположить, что Hsp70 и HspBP1 конкурируют за один участок связывания с Tag7.

Ранее мы также показали, что Hsp70 связывается с 12-ти членным пептидным фрагментом, расположенным в С-концевом участке полипептидной цепи Tag7 (пептидом 17.1). Здесь мы исследовали взаимодействие пептида 17.1 с HspBP1 с помощью аффинной хроматографии. Образец HspBP1 наносили на CN-Br сефарозу с иммобилизованным пептидом 17.1.

Связавшийся материал анализировали с помощью SDS-ПААГ и последующего вестерн-блота со специфическими антителами против HspBP1 (рис. 2). Можно видеть, что в элюате присутствует белок с молекулярной массой 40 кДа, взаимодействующий со специфическими антителами к HspBP1. Следовательно, возможно образование 17.1-HspBP1-комплекса.

Далее проводили сравнительную оценку аффинности этих комплексов. Для оценки белок-белкового взаимодействия HspBP1 с Tag7 и пептидом 17.1 использовали количественный метод микромасштабного термофореза. При добавлении Tag7 и его пептида к меченому HspBP1 были получены четкие кривые связывания при увеличении концентрации исследуемых компонентов (рис. 3, а, 3, б). Данные термофореза демонстрируют, что K_d для комплекса Tag7-HspBP1 составляет 328 нМ, что свидетельствует о низком сродстве этих соединений и низкой стабильности комплекса. Взаимодействие фрагмента Tag7 пептида 17.1 с HspBP1 можно считать высокоспецифичным, так как K_d составляет 3,91 нМ. Можно предположить, что такой комплекс имеет более высокую стабильность.

Следующим этапом исследования была оценка цитотоксической активности полученных комплексов. Ранее было показано, что комплексы Tag7-Hsp70 и 17.1-Hsp70 обладают цитотоксичностью (13). Как упоминалось выше, Tag7 участвует в индукции цитотоксичности при взаимодействии с рецептором TNFR1, индуцирующим альтернативные цитотоксические процессы, апоптоз и некроптоз. Также известно, что максимальная апоптотическая цитотоксичность достигается через 3 ч взаимодействия лиганда с рецептором, некроптоз развивается через 20 ч такого взаимодействия. В связи с этим цитотоксическая активность определялась через 3 и 20 часов взаимодействия лиганда с клетками. Полученные результаты демонстрируют отсутствие цитотоксической активности.

Были приготовлены 4 комплекса: Tag7-HspBP1, а также 17.1-HspBP1 со стехиометрией 1:1 и 1:2, и добавлены к опухолевым клеткам. Цитотоксическая активность определялась через 3 часа и через 20 часов (рис. 4, а и 4, б).

Можно видеть, что комплекс Tag7-HspBP1 не обладал цитотоксической активностью даже при увеличении количества второго компонента. Комплекс 17.1-HspBP1 1:1 также не обладал цитотоксической активностью. Однако комплекс 17.1-HspBP1 1:2 проявлял через 3 часа и через 20 часов с клетками цитотоксичность, подавляемую добавлением анти-TNFR1 антител. Эти результаты позволяют считать, что цитотоксический 17.1-HspBP1 комплекс индуцирует в опухолевых клетках апоптотический и некроптотический процессы программируемой клеточной смерти при взаимодействии комплекса с рецептором TNFR1.

Ранее мы показали, что пептид 17.1 обладает высоким сродством к Hsp70, K_d составляла 7,16 нМ и была сопоставима с K_d для Hsp70 с полноразмерным Tag7 (1,73 нМ) (13). K_d для 17.1-HspBP1, равная 3,91 нМ, также близка к этим значениям. Все три комплекса обладали цитотоксической активностью. K_d для комплекса HspBP1 с полноразмерным Tag7 значительно выше и составляла 328 нМ, что свидетельствует о низкой активности и слабой стабильности комплекса. Можно предположить, что отсутствие цитотоксической активности у Tag7-HspBP1 связано с его диссоциацией при взаимодействии с клетками. Таким образом, установлена корреляция между аффинностью белок-белкового взаимодействия и цитотоксической активностью.

В настоящее время не ясно, почему полноразмерный Tag7 имеет низкое сродство к HspBP1. Возможно, структурный фрагмент этого белка препятствует прочному связыванию HspBP1 с участком полипептидной цепи Tag7, соответствующему пептиду 17.1. Окончательно этот вопрос может быть

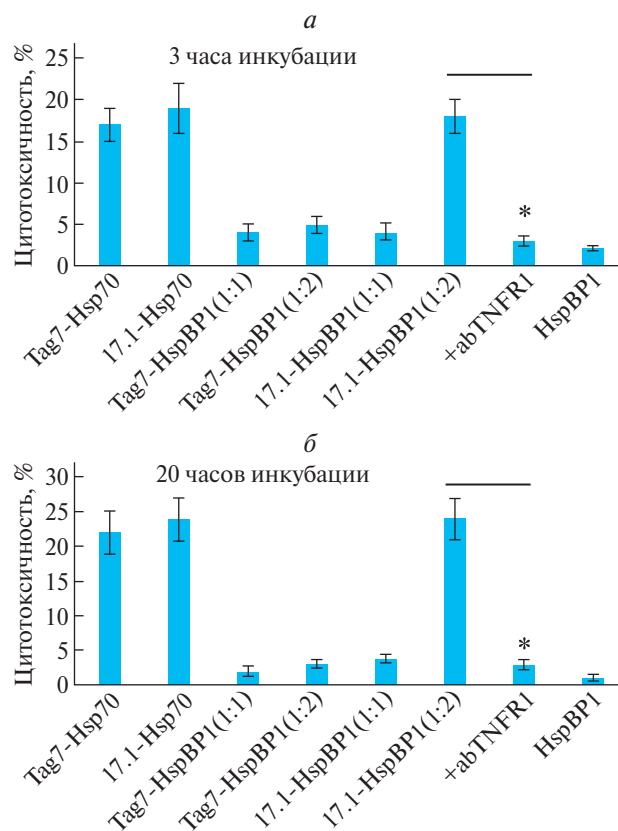


Рис. 4. Цитотоксическая активность комплексов через 3 (а) и 20 часов (б) инкубации с опухолевыми клетками L929. * – $p < 0,05$

решен после проведения рентгеноструктурного анализа. Ранее в наших исследованиях мы продемонстрировали, что HspBP1 является ингибитором цитотоксической активности Tag7-Hsp70 комплекса. Здесь же мы продемонстрировали, что с пептидом Tag7, с которым он связывается значительно сильнее, он может участвовать в индукции цитотоксической активности.

Суммируя вышесказанное, можно отметить, что получен новый высокоаффинный, цитотоксический комплекс, индуцирующий гибель опухолевых клеток при его взаимодействии с рецептором TNFR1.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась при финансовой поддержке Российского научного фонда грант РНФ № 23-14-00076.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Carswell E.A., et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975. V. 72. P. 3666–3670.
2. *Siegmund D., Wajant H.* TNF and TNF receptors as therapeutic targets for rheumatic diseases and beyond // *Nat. Rev. Rheumatol.* 2023. V. 19. P. 576–591.
3. *Huyghe J., Priem D., Bertrand M.J.M.* Cell death checkpoints in the TNF pathway // *Trends Immunol.* 2023. V. 44. P. 628–643.
4. *Shi G., Hu Y.* TNFR1 and TNFR2, Which Link NF- κ B Activation, Drive Lung Cancer Progression, Cell Differentiation, and Metastasis // *Cancers (Basel).* 2023. V. 15. P. 4299.
5. *Gough P., Myles I.A.* Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects // *Front Immunol.* 2020. V. 11. P. 585880.
6. *Ashkenazi A., Salvesen G.* Regulated cell death: signaling and mechanisms // *Annu Rev Cell Dev. Biol.* 2014. V. 30. P. 337–356.
7. *Roberts J.Z., Crawford N., Longley D.B.* The role of Ubiquitination in Apoptosis and Necroptosis // *Cell Death Differ.* 2022. V. 29. P. 272–284.
8. *Kustikova O.S., et al.* Cloning of the tag7 gene expressed in metastatic mouse tumors // *Genetika.* 1996. V. 32. P. 621–628.
9. *Yashin D.V., et al.* Tag7 (PGLYRP1) in Complex with Hsp70 Induces Alternative Cytotoxic Processes in Tumor Cells via TNFR1 Receptor // *J Biol. Chem.* 2015. V. 290. P. 21724–21731.
10. *Yashin D.V., et al.* The Tag7-Hsp70 cytotoxic complex induces tumor cell necroptosis via permeabilisation of lysosomes and mitochondria // *Biochimie.* 2016. V. 123. P. 32–36.
11. *Yashin D.V., et al.* The heat shock-binding protein (HspBP1) protects cells against the cytotoxic action of the Tag7-Hsp70 complex // *J Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 10258–10264.
12. *Bracher A., Verghese J.* Nucleotide Exchange Factors for Hsp70 Molecular Chaperones: GrpE, Hsp110/Grp170, HspBP1/Sil1, and BAG Domain Proteins // *Subcell Biochem.* 2023. V. 101. P. 1–39.
13. *Yurkina D.M., et al.* Short Peptides of Innate Immunity Protein Tag7 (PGLYRP1) Selectively Induce Inhibition or Activation of Tumor Cell Death via TNF Receptor // *Int J Mol Sci.* 2023. V. 24. P. 11363.

HSPBP1 IN COMPLEX WITH THE PEPTIDE OF THE INNATE IMMUNITY PROTEIN TAG7 IS ABLE TO LYSE TUMOR CELLS CARRYING TNFR1 RECEPTOR.

**E. A. Romanova, D. M. Yurkina, D. V. Yashin[#], L. P. Sashchenko,
Academician of the RAS G. P. Georgiev**

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

[#]E-mail: yashin_co@mail.ru

The search for new cytotoxic agents capable of lysing tumor cells is an important task in the fight against cancer. Here we have shown that the protein HspBP1, the chaperone of the heat shock protein Hsp70, is able to form a complex with the previously discovered peptide (17.1) of the innate immunity protein Tag7. Experiments using thermophoresis have demonstrated that the affinity of the Tag7 protein peptide 17.1 to the HspBP1 molecule is 100 times higher than that of the full-sized Tag7 molecule. The addition of the 17.1-HspBP1 complex to tumor cells induces apoptosis and necroptosis in them. The results obtained in this work can be used to develop promising antitumor drugs.

Keywords: Tag7, HspBP1, tumor cells, cytotoxicity, 17.1 peptide