

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Круглова Наталья Андреевна

**УЧАСТИЕ АССОЦИИРОВАННОГО С ФОСФАТАЗОЙ ЛИМФОЦИТАРНОГО
ФОСФОПРОТЕИНА (LPAР) В ПРОЦЕССАХ АКТИВАЦИИ Т-КЛЕТОК**

03.03.03 – Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре иммунологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

- Научный руководитель** – **Филатов Александр Васильевич** – доктор биологических наук, профессор
- Официальные оппоненты** – **Ширинский Владимир Павлович** – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной подвижности Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации
- **Кондратьева Татьяна Константиновна** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики отдела иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»
- **Шаронов Георгий Владимирович** – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул отдела структурной биологии ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН

Защита диссертации состоится «28» октября 2019 г. в 18:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.12 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. ББА.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»:

<https://istina.msu.ru/dissertations/232477723/>

Автореферат разослан ____ сентября 2019 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Д.Б. Киселевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

При активации лимфоцитов через антиген-специфический рецептор развивается внутриклеточный каскад реакций, в котором участвуют киназы и фосфатазы, а также адаптерные белки, лишенные каталитической активности, но необходимые для работы ферментов и сборки макромолекулярных комплексов. Трансмембранный белок лимфоцитов LPAP (Lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein) претендует на роль такого адаптерного белка.

LPAP был впервые описан как партнер фосфатазы CD45, играющей важную роль в активации лимфоцитов. 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. Однако тесная связь LPAP с фосфатазой CD45 и его множественное фосфорилирование позволяют предположить, что этот белок – один из участников активационного каскада. Молекула CD45 способна регулировать киназу Lck, необходимую для запуска активационного каскада после стимуляции TCR. Взаимодействуя с CD45, LPAP может влиять на передачу сигнала от антигенспецифического рецептора.

Ранее было обнаружено, что белок LPAP в Т-клетках существует в виде как минимум пяти протеоформ, четыре из которых являются фосфоформами. Были идентифицированы три сайта фосфорилирования LPAP, Ser-99, Ser-153 и Ser-172, и проведено отнесение этих сайтов индивидуальным фосфоформам белка. Однако участие LPAP в сигнальных путях лимфоцитов все еще остается неизученным. Не установлено, какие клеточные стимулы способны изменять статус фосфорилирования LPAP, какова кинетика этого изменения и какие киназы ответственны за эти события. Молекулярные партнеры LPAP, кроме фосфатазы CD45, также неизвестны. Наконец, требует более детального исследования функциональная связь между LPAP и CD45. Ответы на все эти вопросы могут помочь приблизиться к пониманию функции LPAP и открыть новые детали активации лимфоцитов.

Цель работы – исследовать участие белка LPAP в процессах активации лимфоцитов. Для достижения этой цели были сформулированы следующие **задачи**:

- 1) Исследовать фосфорилирование LPAP в условиях активации лимфоцитов:

- а) Охарактеризовать паттерн фосфорилирования LPAP в активированных Т, В, NK-клеточных линиях и первичных лимфоцитах;
 - б) Выявить клеточные стимулы, под действием которых изменяется статус фосфорилирования LPAP, а также описать кинетику фосфорилирования белка LPAP в ответ на стимуляцию клеток Jurkat;
 - с) С помощью ингибиторного анализа определить киназы, участвующие в фосфорилировании LPAP в клетках Jurkat.
- 2) С помощью коиммунопреципитации/масс-спектрометрии (co-IP/MS) и нативного голубого электрофореза (Blue Native PAGE) провести поиск белков, взаимодействующих с LPAP в Т-клетках СЕМ и Jurkat.
- 3) Исследовать функциональную связь взаимодействия между LPAP и CD45:
 - а) Определить уровень экспрессии LPAP и CD45 в отсутствие белка-партнера;
 - б) Оценить экспрессию CD45 в клетках Jurkat с различным уровнем белка LPAP.

Научная новизна работы

В работе впервые предпринята попытка установить связь между фосфорилированием белка LPAP и процессами активации лимфоцитов. Впервые проанализировано фосфорилирование белка LPAP при активации различных типов клеток, включая первичные клетки. Изучена кинетика фосфорилирования LPAP и идентифицирован новый сайт Ser-163, претерпевающий фосфорилирование только в условиях активации лимфоцитов. Впервые с помощью ингибиторного анализа и *in vitro* киназного теста показано, что ERK1/2 способна фосфорилировать LPAP по Ser-163. Иными словами, обнаружен новый субстрат многофункциональной киназы ERK1/2.

Впервые проведен систематический поиск белков-партнеров LPAP. Выдвинуто предположение о том, что единственным функциональным партнером LPAP может быть фосфатаза CD45.

Для изучения роли LPAP методом «loss-of-function» впервые получена поликлональная популяция клеток Jurkat, нокаутных по этому белку, а также панель клеточных линий с различным уровнем LPAP. Впервые показана корреляция между уровнями белка LPAP и белка CD45 в клетках Jurkat. Выдвинута гипотеза о том, что функция LPAP может состоять в регуляции уровня CD45 в клетке.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты работы позволяют сформулировать гипотезу о том, что функция LPAP состоит в регуляции уровня CD45 в клетке. Это исследование представляет ценность, поскольку позволяет приблизиться к пониманию функции белка LPAP и может лечь в основу дальнейших экспериментов, направленных на изучение регуляции CD45 и активационного сигнального каскада лимфоцитов в целом.

Результатом, важным с практической точки зрения, являются полученные в ходе работы инструменты, необходимые для дальнейшего изучения роли LPAP в лимфоцитах. Это моноклональные антитела к «активационному» сайту фосфорилирования LPAP – Ser-163, а также панель клеточных линий, нокаутных по LPAP, и линий с различным уровнем этого белка.

Методология и методы исследования

Статус фосфорилирования LPAP оценивали в клетках Jurkat, CEM, HUT78, Raji, KG1a, YT, а также в первичных клетках PBMC и тимоцитах в норме и в условиях активации под действием фоболмиристатацетата или антител против антигенспецифических рецепторов Т- и В-клеток.

Статус фосфорилирования LPAP анализировали с помощью нескольких электрофоретических методов: двумерного электрофореза, фосфо-аффинного электрофореза, Вестерн блоттинга с проявкой фосфоспецифическими антителами, а также электрофореза в высокопроцентном геле, в котором некоторые фосфоформы LPAP имеют измененную электрофоретическую подвижность.

В условиях активации клеток была выявлена дополнительная фосфоформа LPAP и выдвинуто предположение, что ее появление связано с фосфорилированием LPAP по новому сайту. Для определения этого «активационного» сайта использовали масс-спектрометрию, результаты которой подтверждали двумя дополнительными методами: анализом электрофоретических паттернов белка LPAP, мутантного по предполагаемым сайтам фосфорилирования, а также с помощью фосфо-специфических антител.

Чтобы определить, какие сигнальные пути лимфоцитов приводят к изменению статуса фосфорилирования LPAP, в первую очередь оценивали фосфорилирование LPAP в ответ на активацию клеток под действием различных стимулов и определяли кинетику изменений. Во-вторых, использовали ингибиторный анализ с целью определить

киназу, ответственную за фосфорилирование LPAP по Ser-163. Для независимого подтверждения результатов ингибиторного анализа применяли *in vitro* киназный тест.

Поиск белков-партнеров LPAP вели с помощью нескольких методов. Для обнаружения прочных комплексов использовали иммунопреципитационный анализ с флуоресцентной меткой (FIPA) и ко-иммунопреципитацию с последующим масс-спектрометрическим анализом (co-IP/MS). Для детекции слабых взаимодействий образцы перед co-IP/MS предварительно стабилизировали с помощью кросс-линкеров.

Для изучения взаимосвязи между экспрессией LPAP и CD45 с помощью технологии CRISPR/Cas9 были получены нокаутные по LPAP или по CD45 клетки. В случае белка LPAP использовали также метод SORTS, позволяющий получать поликлональные популяции нокаутов по внутриклеточному белку. Оценку уровня CD45 в зависимости от уровня LPAP проводили на клетках Jurkat LPAP KO, стабильно трансдуцированных конструкциями с геном LPAP WT.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В активированных Т-клеточных линиях Jurkat и CEM, а также в мононуклеарах периферической крови присутствует новая протеоформа белка LPAP, связанная с его фосфорилированием по Ser-163.
2. При активации клеток Jurkat происходит дефосфорилирование LPAP по Ser-99 и Ser-172 и фосфорилирование по Ser-163.
3. Киназа ERK фосфорилирует LPAP по Ser-163.
4. Единственным надежно подтвержденным партнером LPAP является фосфатаза CD45.
5. Экспрессия CD45 и LPAP в клетках Jurkat взаимосвязана: при снижении уровня LPAP или CD45 экспрессия белка-партнера падает.

Личный вклад автора

Результаты работы получены автором или при его участии. Вклад автора состоит в планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе результатов, подготовке публикаций и докладов, написании текста диссертации.

Достоверность результатов

Результаты диссертационной работы получены на сертифицированном откалиброванном оборудовании. Проведено необходимое количество повторностей. Использованы корректные методики и расчеты. Для сравнения авторских данных с ранее опубликованными данными по исследуемой тематике привлекаются независимые источники. Выводы работы обоснованы и соответствуют полученным результатам.

Апробация результатов и публикации

Результаты диссертационной работы были представлены на конференциях и научных школах: XV научная конференция молодых ученых «Иммунология сегодня: традиции и инновации» (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Россия, 22 апреля 2016), Biomembranes 2016 (Долгопрудный, Россия, 26-30 сентября 2016), V Съезд Биохимиков России (Сочи, Россия, 4-8 октября 2016), XVI Научный форум имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, Россия, 5-8 июня 2017), 42nd FEBS Congress «From Molecules to Cells and Back», (Иерусалим, Израиль, 10-14 сентября 2017), EMBO Conference «Lymphocyte Antigen Receptor Signalling» (Сиена, Италия, 25-29 августа 2018), 10th EFIS/EJI South East European Immunology School (SEEIS2018) (Ереван, Армения, 19-22 октября 2018),

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ: 4 статьи в рецензируемых научных изданиях и 8 тезисов.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 227 источников. Работа изложена на 140 страницах, содержит 36 рисунков и 2 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Работа включает три смысловые части. Первая часть посвящена изучению фосфорилирования LPAR. Ранее наш коллектив показал, что LPAR фосфорилируется по трем сайтам, однако детали этого процесса и его связь с сигналингом лимфоцитов оставались неизвестными. Мы поставили перед собой задачу изучить фосфорилирование LPAR в условиях активации клеток. Для этого мы охарактеризовали паттерн фосфорилирования LPAR в различных клеточных линиях и первичных клетках в норме и в условиях активации, исследовали кинетику фосфорилирования LPAR под действием различных стимулов и провели ингибиторный анализ, для того чтобы установить киназы, ответственные за эти изменения.

Вторая часть работы состояла в поиске белков-партнеров LPAR. Кроме фосфатазы CD45, молекулярные партнеры LPAR неизвестны. Их исследование важно с двух точек зрения. Во-первых, это является необходимым шагом на пути к пониманию функции LPAR. Во-вторых, LPAR может связывать молекулу CD45 с еще не описанными белками, изучение которых откроет новые детали регуляции CD45 и активации лимфоцитов в целом.

Наконец, в третьей части изучена функциональная связь между LPAR и его партнером CD45. Мы исследовали экспрессию обоих белков в отсутствие соответствующего белка-партнера и оценили уровень CD45 в клетках с различным уровнем LPAR.

1. Фосфорилирование LPAR в условиях активации клеток

1.1. Паттерн фосфорилирования LPAR в условиях активации клеток

Ранее нами было показано, что в покое LPAR фосфорилирован по трем сайтам: Ser-99, Ser-153 и Ser-172. В 18% геле LPAR мигрирует в виде двух полос (1D-PAGE) или двух цепочек пятен (2D-PAGE). С помощью серии точечных мутантов было проведено соотнесение между тремя сайтами фосфорилирования LPAR, выявляемыми в неактивированных клетках, и полосами или пятнами, наблюдаемыми на одно- и двумерном геле (Kruglova et al. 2017, интерпретация воспроизведена на Рис. 1 слева).

При стимуляции клеток CEM и Jurkat с помощью форболмиристатацетата (PMA), активатора протеинкиназы C, нижняя полоса LPAR исчезала, что свидетельствовало о дефосфорилировании LPAR по Ser-172 (Рис. 1А). Результаты двумерного электрофореза

также показали, что при активации клеток число пятен LPAP уменьшалось, а значит, происходило частичное дефосфорилирование белка (Рис. 1Б).

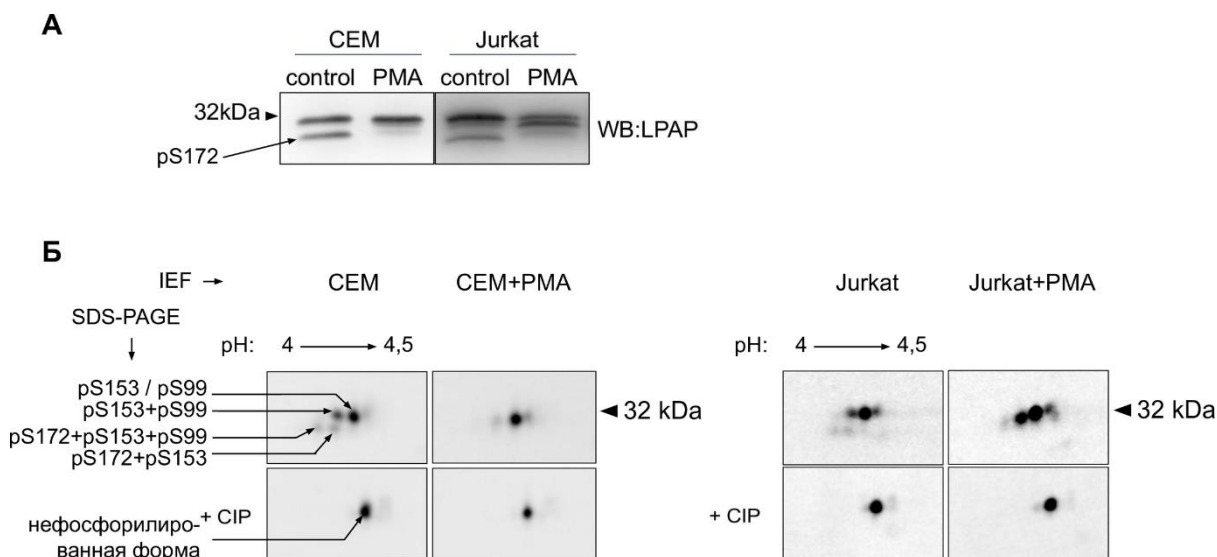


Рис. 1. Изменение паттерна фосфорилирования LPAP при активации Т-клеток с помощью PMA. Клетки CEM и Jurkat инкубировали в присутствии PMA (10 нг/мл) в течение 30 мин. (А) Иммунопреципитированный LPAP разделяли методом электрофореза в 18% геле и проводили Вестерн блоттинг с проявкой антителом против тотального белка LPAP. (Б) Для анализа образцов методом двумерного электрофореза покоящиеся или активированные с помощью PMA клетки CEM и Jurkat метили красителем Cy5 или Cy3. LPAP иммунопреципитировали и образец, меченный Cy3, дефосфорилировали с помощью фосфатазы CIP. Образцы, меченные Cy5 и Cy3, объединяли и подвергали двумерному электрофорезу.

Для более детального разрешения протеоформ LPAP, различающихся не только по количеству фосфогрупп, но и по их положению, был использован метод фосфоаффинного электрофореза. Используя серию точечных мутантов, мы установили соответствие между наблюдаемыми полосами и тремя сайтами фосфорилирования LPAP (интерпретация приведена на Рис. 2 слева), после чего сравнили паттерны фосфорилирования LPAP в клеточных линиях CEM и Jurkat (Рис. 2). В обеих линиях при активации происходило дефосфорилирование LPAP по Ser-99 и Ser-172, о чем свидетельствовало исчезновение трех верхних полос, содержащих pSer-99 и pSer-172. Фосфорилирование по Ser-153 сохранялось. Мы обратили внимание на то, что на электрофореграмме появлялась дополнительная полоса между полосами P1 и P2 (показана на Рис. 2 тонкими стрелками). Эта полоса исчезала после обработки CIP, а

значит, представляла собой фосфоформу. Мы предположили, что появление этой полосы связано с фосфорилированием LPAP по новому четвертому сайту фосфорилирования.

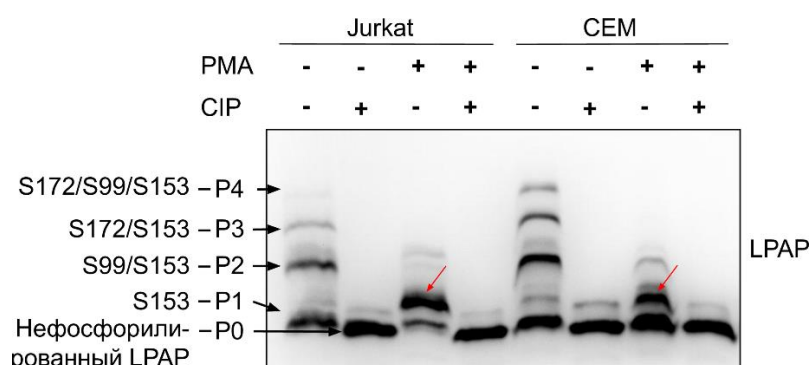


Рис. 2. Обнаружение «активационного» сайта фосфорилирования LPAP.

Клетки линий CEM и Jurkat активировали в присутствии 10 нг/мл PMA, белок LPAP выделяли на аффинном сорбенте. Половину образца обрабатывали фосфатазой CIP, затем образцы разделяли методом фосфо-аффинного электрофореза в 10% геле с 50 мкМ Phos-tag, проводили Вестерн блоттинг с антителом против LPAP. Слева от электрофореграммы приведены условные обозначения полос (P0, P1, P2, P3, P4) и приписанные им сайты фосфорилирования. Тонкими стрелками показана новая фосфоформа LPAP.

1.2. Идентификация активационного сайта фосфорилирования LPAP

Для идентификации нового сайта фосфорилирования мы использовали масс-спектрометрический анализ, который показал, что этим сайтом является Ser-163. Для подтверждения этого результата был проведен анализ фосфоформ мутантного белка LPAP с помощью Phos-tag-PAGE. Только замена по положению Ser-163 приводила к исчезновению активационной полосы LPAP (Рис. 3А). Наконец, третьим подтверждением стало получение фосфоспецифических моноклональных антител против пептида CDLVLGpSPGPA, включающего pSer-163. Эти антитела распознавали белок LPAP из активированных клеток и не реагировали с белком из покоящихся клеток и белком, обработанным фосфатазой CIP (Рис. 3Б).

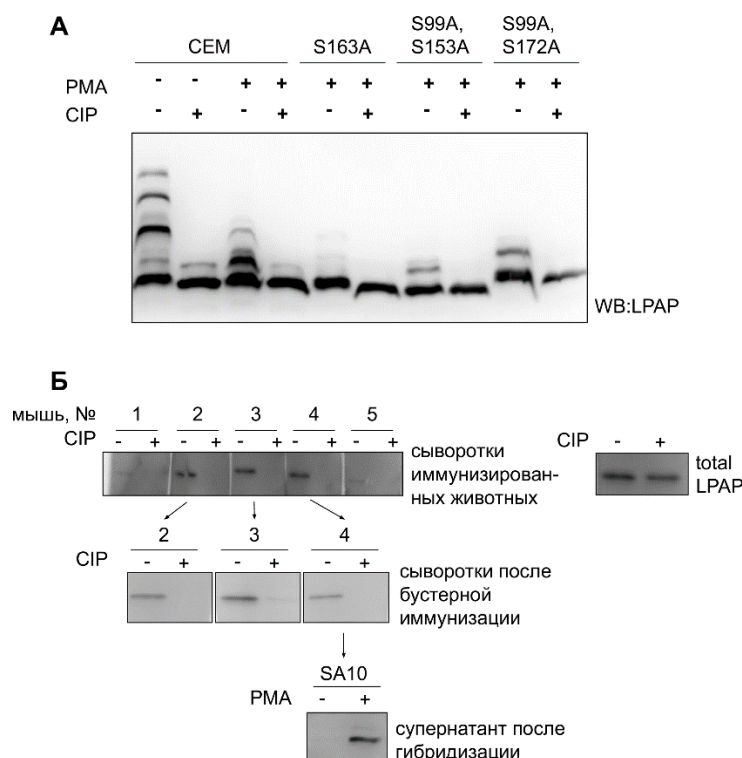


Рис. 3. Ser-163 является «активационным» сайтом фосфорилирования LPAP. (А) Клетки линии CEM LPAP KO, трансфицированные плазмидами с мутантными формами LPAP (S163A, S99A/S153A или S99A/S172A) и клетки CEM дикого типа активировали в течение 1 ч с помощью 10 нг/мл PMA, контрольные образцы оставляли без активации, белок LPAP выделяли на аффинном сорбенте. Половину образца обрабатывали фосфатазой CIP, затем образцы разделяли методом фосфо-аффинного электрофореза в 10% геле с 50 мкМ Phos-tag, проводили Вестерн блоттинг с антителом против LPAP. (Б) Тестирование сывороток и моноклональных антител (SA10) против pSer-163 проводили с помощью Вестерн-блоттинга с образцами LPAP из PMA-активированных клеток. Контрольные образцы подвергали дефосфорилированию *in vitro* (CIP+).

1.3. Характеристика протеоформ белка LPAP в различных клеточных линиях и первичных клетках в норме и в условиях активации

Белок LPAP экспрессируется в различных Т-, В-, НК-клеточных линиях, однако данные об особенностях фосфорилирования белка в этих линиях отсутствуют. С помощью двумерного электрофореза мы сравнили протеоформы LPAP из линий Т-клеток (CEM, Jurkat, HUT78), В-клеток (Raji), НК-клеток (YT), клеток миелоидной линии дифференцировки (KG1a) и первичных клеток (PBMC). Во всех этих линиях

набор протеоформов LPAP оказался сходным как в норме, так и в условиях активации и различался лишь по соотношению интенсивностей отдельных пятен (Рис. 4).

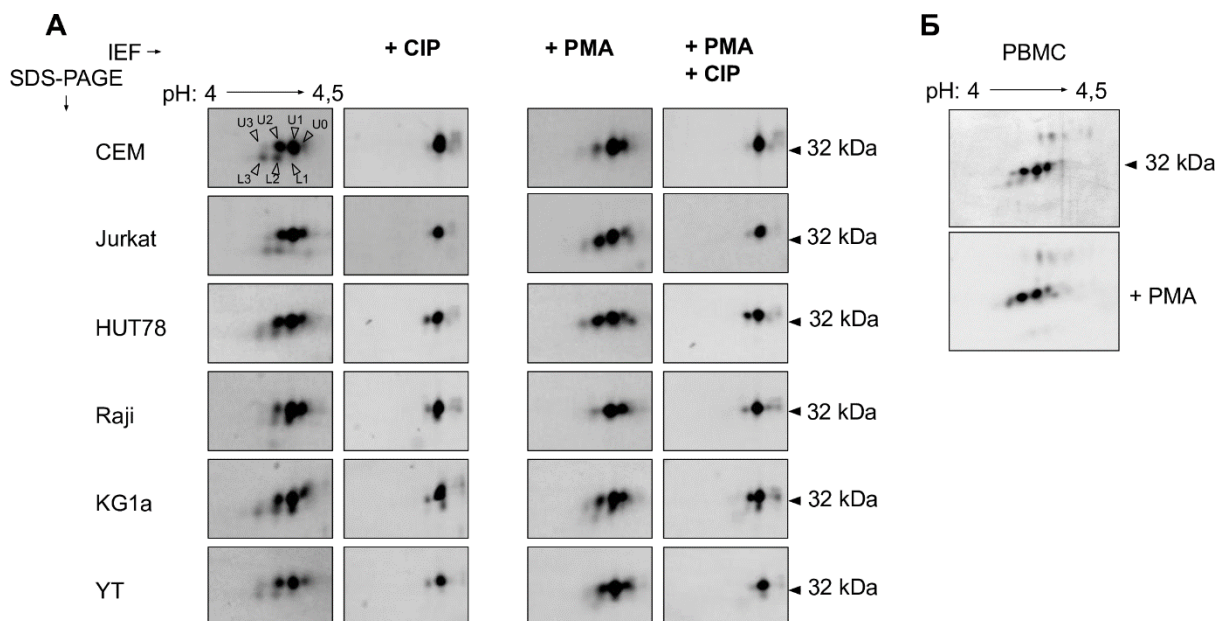


Рис. 4. Протеоформы белка LPAP в различных клеточных линиях в норме и при активации. (А) Неактивированные клетки (столбцы 1 и 2) или клетки, стимулированные с помощью 10 нг/мл РМА в течение 4 ч (столбцы 3 и 4), метили флуоресцентным красителем Су3 или С5, лизировали и иммунопреципитировали белок LPAP. Выделенный на сорбенте белок, меченный Су3, дефосфорилировали в присутствии фосфатазы СІР. Элюированные образцы, меченные Су5 или Су3, смешивали в соотношении 1:1 и проводили двумерный электрофорез. после чего детектировали сигнал флуоресценции. (Б) РВМС активировали с помощью 10 нг/мл РМА в течение 4 ч (+РМА) или оставляли неактивированными, затем образцы готовили подобно описанному в (А), но без дефосфорилирования.

1.4. Поиск стимулов, влияющих на фосфорилирование LPAP

Для выяснения функциональной роли фосфорилирования белка очень важно установить, при активации каких сигнальных путей это событие происходит. Ранее было показано, что паттерн фосфорилирования LPAP изменяется под действием реагента форболмиристатацетата (РМА), активатора РКС (Schraven et al. 1994; Kruglova et al. 2017). Мы расширили круг стимулов и включили в него кросс-линкирующие антитела против TCR и BCR, а также ионофоры.

Наиболее выраженным действием обладал реагент РМА, под влиянием которого происходило дефосфорилирование сайтов Ser-172 и Ser-99, а также фосфорилирование Ser-163 (Рис. 5А, дорожка 2). Эти изменения для простоты далее обозначены как «активационный фенотип LPAP». При стимуляции клеток путем кросс-линкирования CD3 мы наблюдали те же качественные, но менее интенсивные изменения (Рис. 5А, дорожка 3). Ca^{2+} ионофоры, A23187 и иономицин, а также тапсигаргин практически не влияли на статус Ser-99 и Ser-172, но вызывали умеренное фосфорилирование Ser-163. Стимуляция В-клеток с помощью РМА или путем кросс-линкирования BCR также вызывала фосфорилирование LPAP по Ser-163 (Рис. 5Б). Однако эффект физиологического лиганда был выражен слабее по сравнению с эффектом РМА.

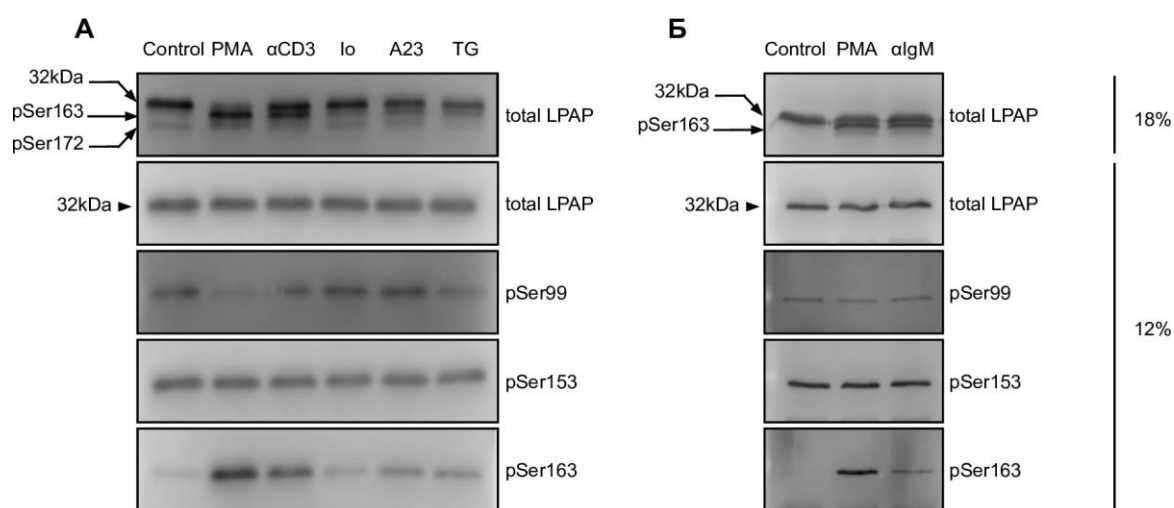


Рис. 5. Статус фосфорилирования LPAP в активированных лимфоцитах. Клетки Jurkat (А) или Daudi (Б) инкубировали в присутствии или в отсутствие указанного стимула в течение 30 мин. Иммунопреципитированный белок LPAP разделяли с помощью SDS-электрофореза в 12% или 18% геле (как отмечено справа) и анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с проявкой антителом против тотального белка LPAP или указанным фосфоспецифическим антителом. Использовали следующие концентрации стимулов: РМА 10 нг/мл, αCD3 mAb ОКТ3 1 мкг/мл, иономицин (Io) 1 мкМ, A23187 (A23) 5 мкМ, тапсигаргин (TG) 2 мкМ, αIgM Ab CH2 10 мкг/мл. Верхняя стрелка указывает на основную полосу при 32 кДа, содержащую нефосфорилированный LPAP и LPAP, фосфорилированный по Ser-99 и Ser-153. Две другие стрелки указывают на полосы при 30 и 28 кДа, содержащие LPAP, фосфорилированный по Ser-163 и Ser-172 соответственно.

1.5. Кинетика фосфорилирования LPAP

На следующем этапе была проанализирована кинетика (де)фосфорилирования LPAP в ответ на активацию лимфоцитов (Рис. 6). Через пять минут после добавления РМА происходило дефосфорилирование LPAP по Ser-172 (Рис. 6А) и частичное дефосфорилирование по Ser-99 (Kruglova et al. 2017). В то же время появлялась полоса, соответствующая pSer-163, которая достигала максимальной интенсивности через 20 мин и сохраняла ее на протяжении всего времени измерения (до 4 ч). Фосфорилирование по Ser-153 не изменялось в условиях активации.

Стимуляция клеток через Т-клеточный рецептор приводила к тем же изменениям, что и РМА-активация – дефосфорилированию Ser-172 и фосфорилированию Ser-163 (Рис. 6Б). Однако в отличие от РМА-активации, изменения носили временный характер.

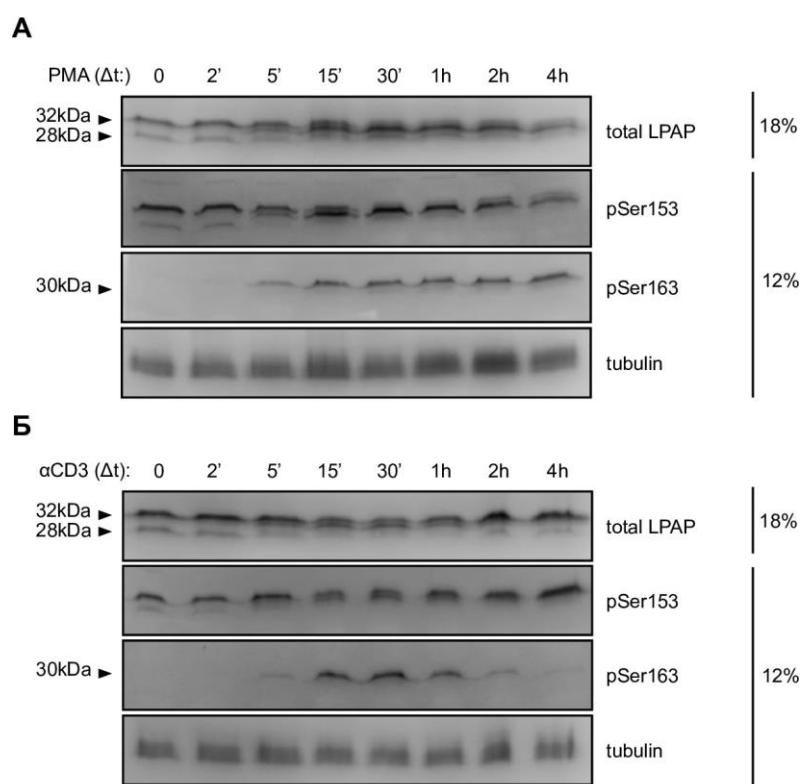


Рис. 6. Кинетика фосфорилирования LPAP в активированных Т-клетках. Клетки Jurkat активировали в присутствии 10 нг/мл РМА (А) или 1 мкг/мл α CD3 mAb ОКТ3 (Б). Иммунопреципитированный белок LPAP разделяли с помощью SDS-электрофореза в 12% или 18% геле (как отмечено) и анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с проявкой антителом, указанным справа.

1.6. Влияние фосфорилирования на стабильность белка LPAP

Мы показали, что более 80% молекул LPAP в клетке конститутивно фосфорилировано по Ser-153. Фосфорилирование способно регулировать стабильность белка: в некоторых случаях оно увеличивает время жизни белка, в других, наоборот, служит сигналом к деградации. Ранее мы высказали предположение, что фосфорилирование по Ser-153 защищает LPAP от деградации (Цой и соавт. 2018). Для проверки этой гипотезы мы сравнили скорость деградации LPAP дикого типа и LPAP, мутантного по Ser-153, при инкубации клеток с блокатором трансляции циклогексимидом (Рис. 7). По результатам серии экспериментов был сделан вывод о том, что мутация S153A не влияла на скорость деградации LPAP.

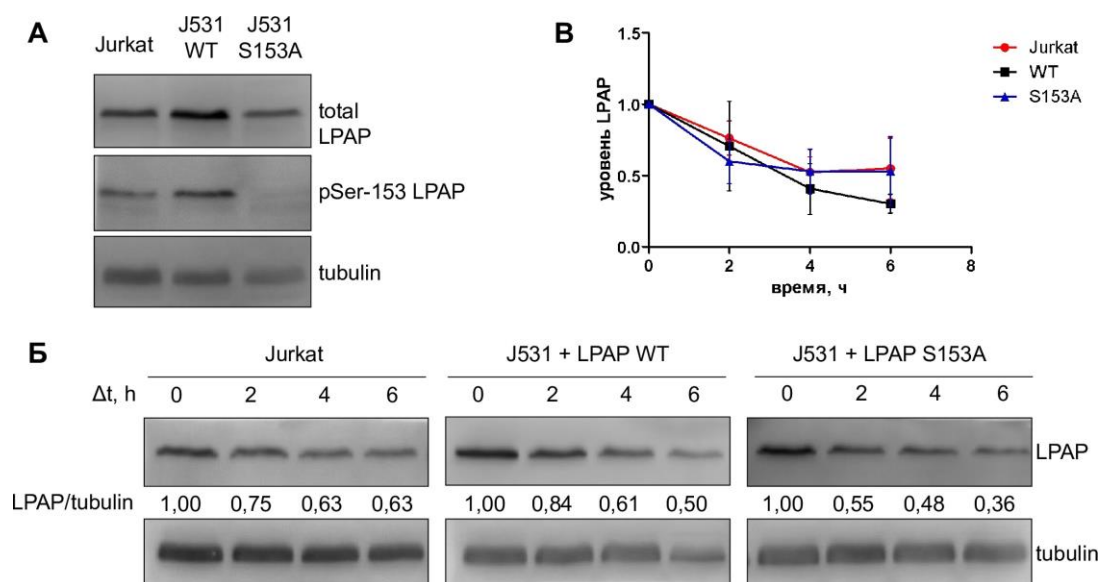


Рис. 7. Фосфорилирование по Ser-153 не влияет на скорость деградации LPAP. Клетки линий Jurkat, Jurkat LPAP S153A и Jurkat LPAP WT инкубировали в присутствии циклогексимида (CHX) в течение 2, 4 и 6 ч, затем лизировали и определяли уровень LPAP с помощью Вестерн блоттинга. Линии Jurkat LPAP S153A и Jurkat LPAP WT были получены из линии Jurkat, нокаутной по LPAP (J531), путем лентивирусной трансфекции конструкций, несущих LPAP S153A или LPAP WT. (А) Уровень экспрессии LPAP, (Б) оценка его деградации и (В) количественный обсчет данных по трем независимым экспериментам, приведены средние значения $\pm$ SD.

1.7. Поиск киназ и фосфатаз, участвующих в фосфорилировании LPAP

Чтобы определить, какая ветвь сигнального каскада влияет на статус фосфорилирования LPAP, мы применили ингибиторный анализ.

1.7.1. Ингибирование РКС препятствует появлению активационного фенотипа LPAR

Данные по влиянию различных стимулов на статус фосфорилирования LPAP послужили отправной точкой для выбора ингибиторов. Наиболее выраженное изменение фосфорилирования LPAP происходило под действием реагента РМА, который имитирует диацилглицерол (DAG). Главными мишенями DAG в клетке являются PKC, PKD и RasGRP (Krishna et al. 2013). Среди трех классов изоформ PKC классические изоформы PKC зависят ионов кальция и DAG, новые изоформы – от DAG, в то время как атипичные изоформы не зависят ни от кальция, ни от DAG. С учетом этих сведений в первую очередь решено было проверить вклад новых изоформ PKC в фосфорилирование LPAP по Ser-163. В согласии с нашим предположением, ингибитор PKC широкого спектра действия Go6983 препятствовал исчезновению фосфоформы pSer-172 и появлению pSer-163 под действием РМА (Рис. 8А) и ослаблял эти события в случае α CD3 активации. В то же время ингибитор классических изоформ PKC Go6976 не оказывал влияния на этот процесс (Рис. 8Б).

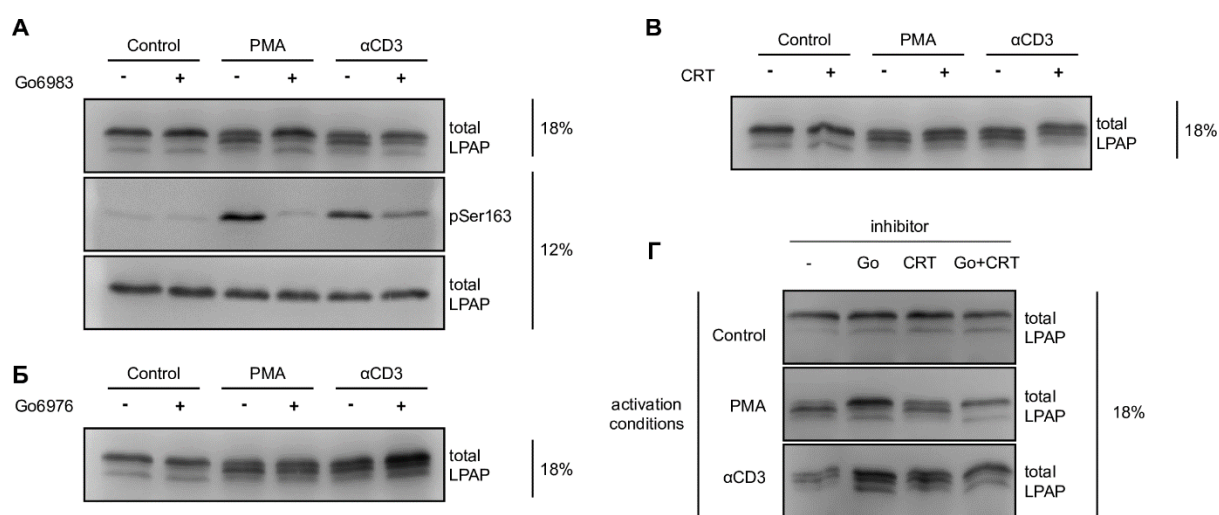


Рис. 8. Вклад ингибиторов РКС в фосфорилирование LPAP по Ser-163.

Клетки Jurkat инкубировали в присутствии (+) или в отсутствие (-) указанного ингибитора в течение 1 ч, после чего активировали с помощью РМА (10 нг/мл) или α CD3 mAb (1 мкг/мл) в течение 30 мин, контрольные образцы не подвергали активации. Иммунопреципитированный белок LPAP разделяли с помощью SDS-электрофореза в 12% или 18% геле (как отмечено) и анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с проявкой антителом против тотального белка LPAP или антителом против p-Ser163-LPAP. Использовали следующие концентрации стимулов: (А) Go6983 (10 мкМ), (Б)

Go6976 (10 мкМ), (В) CRT0066101 (CRT, 5 мкМ), (Г) Go6983 (10 мкМ) + CRT0066101 (Go+CRT, 5 мкМ).

Кроме PKC, PMA активирует киназу PKD, каталитическая активность которой дополнительно усиливается за счет новых изоформ PKC. Ингибитор PKD CRT0066101 не оказывал заметного влияния на фосфорилирование LPAP (Рис. 8В), однако усиливал эффект ингибитора PKC Go6983 (Рис. 8Г), что особенно заметно в случае α CD3 активации.

1.7.2. ERK1/2, но не p38 MAPK или JNK регулирует фосфорилирование LPAP по Ser-163

Имитируя действие DAG, PMA активирует не только PKC и PKD, но и RasGRP, который запускает MAPK-киназный каскад (Navarro and Cantrell 2014). Для проверки предположения о том, что киназы MAPK-каскада вносят вклад в фосфорилирование LPAP по Ser-163, были протестированы ингибиторы Raf (Lifirafenib), MEK1/2 (Trametinib), а также ингибитор ERK1/2 (SCH772984). Кроме того, в анализ были включены ингибиторы двух других ветвей MAPK-каскада: блокаторы p38 (VX-745) и JNK (SP600125). Ингибиторы киназ Raf (Рис. 9А), MEK1/2 (Рис. 9Б) и ERK1/2 (Рис. 9В) в значительной степени препятствовали появлению активационного фенотипа LPAP. В то же время комбинация ингибиторов против p38 и JNK не оказывала влияния на фосфорилирование LPAP при α CD3-стимуляции (Рис. 9Г).

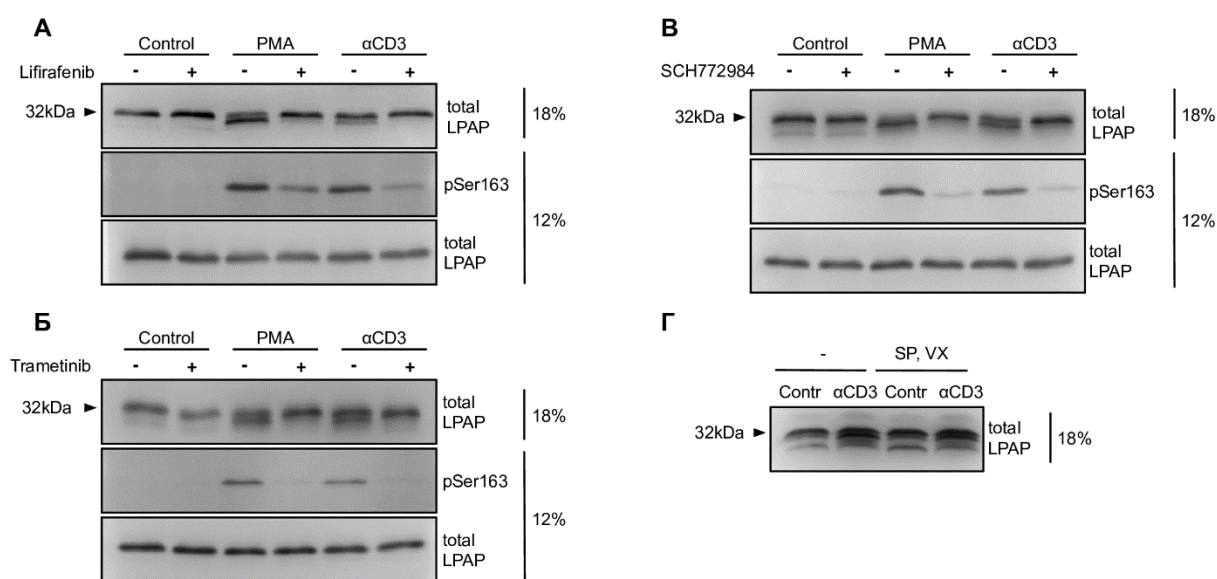


Рис. 9. Ингибиторы MAPK-каскада блокируют фосфорилирование LPAP по Ser-163. Клетки Jurkat инкубировали в присутствии (+) или в отсутствие (-) указанного слева ингибитора, после чего активировали с помощью PMA (10 нг/мл) или α CD3 mAb

(1 мкг/мл) в течение 30 мин, контрольные образцы не подвергали активации. Иммунопреципитированный белок LPAP разделяли с помощью SDS-электрофореза в 12% или 18% геле (как отмечено) и анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с проявкой антителом против тотального белка LPAP или антителом против pSer-163-LPAP. Использовали следующие концентрации стимулов: (А) Lifirafenib (Lif, 10 мкМ, 2 ч), (Б) Trametinib (Tram, 100 нМ, 2 ч), (В) SCH772984 (SCH, 1 мкМ, 2 ч), (Г) SP600125 (SP) + VX-745 (VX) (10 мкМ каждый, 30 мин).

1.7.3. ERK фосфорилирует LPAP по Ser-163 *in vitro*

Результаты ингибиторного анализа показали, что фосфорилирование LPAP по Ser-163 связано с активностью MAPK-киназного каскада. Киназа ERK1/2 является последним звеном цепи, ингибирование которого в наших экспериментах полностью блокировало активационный фенотип LPAP. Ингибирование других пролин-направленных киназ, mTOR, Cdc2, CDK2 и CDK5, в наших экспериментах не влияло на статус фосфорилирования Ser-163. Мы предположили, что именно киназа ERK1/2 ответственна за фосфорилирование LPAP по Ser-163. Для проверки этого предположения был проведен *in vitro* киназный тест. LPAP из активированных клеток Jurkat, выделенный на аффинном сорбенте и подвергнутый дефосфорилированию *in vitro*, инкубировали в присутствии рекомбинантной ERK1 или ERK2 и оценивали фосфорилирование Ser-163 с помощью Вестерн-блоттинга. Добавление к образцу 500 нг киназы ERK1 приводило к выраженному фосфорилированию Ser-163, а в присутствии 1000 нг этой киназы уровень pSer-163 восстанавливался до контрольного (Рис. 10А). Действие киназы ERK1 было специфично в отношении Ser-163, так как добавление ERK1 никак не влияло на фосфорилирование Ser-153. Те же количества киназы ERK2 оказывали минимальное влияние на фосфорилирование LPAP (Рис. 10Б). Таким образом, *in vitro* киназный тест, показал, что ERK1 может напрямую фосфорилировать LPAP.

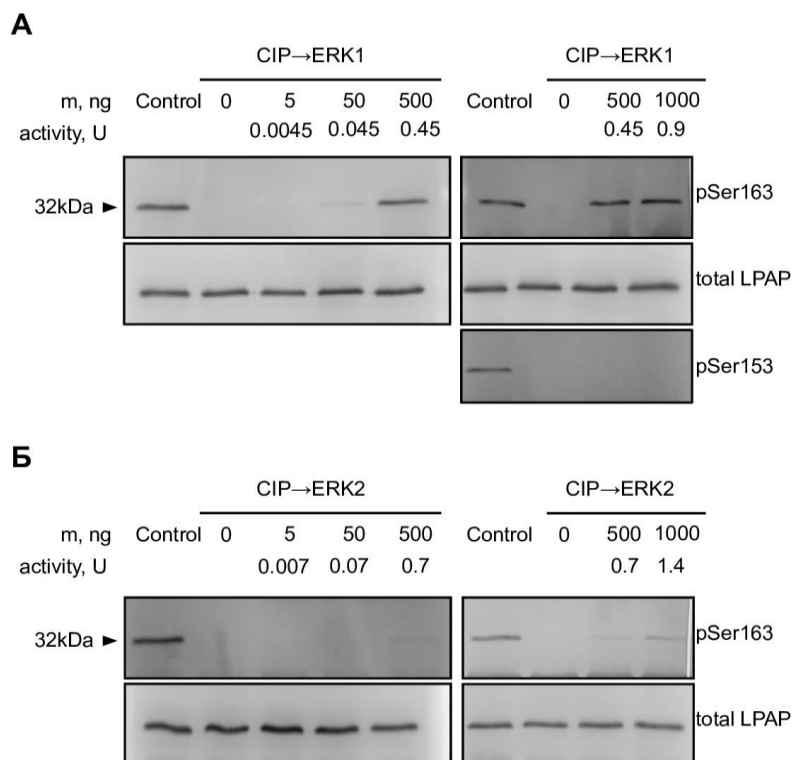


Рис. 10. ERK *in vitro* фосфорилирует LPAP по Ser-163. Клетки Jurkat активировали с помощью PMA (10 нг/мл) в течение 30 мин. LPAP выделяли на аффинном сорбенте и обрабатывали с помощью фосфатазы CIP. Контрольный образец не подвергали дефосфорилированию (дорожка 1). *In vitro* киназный тест проводили с указанным количеством активной ERK1 (А) или ERK2 (Б) при 37 °С в течение 30 мин. LPAP разделяли с помощью SDS-электрофореза в 12% геле и анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с проявкой антителом против тотального белка LPAP, антителом против pSer-163-LPAP или pSer-153-LPAP.

2. Поиск белков-партнеров LPAP

Участие белка в том или ином клеточном процессе можно предсказать, изучив, с какими молекулами-партнерами белок взаимодействует. Для изучения интерактома белка LPAP мы использовали ряд протеомных методов, позволяющих детектировать как прочные, так и слабые и/или временные взаимодействия. С помощью метода FIPA нами было идентифицировано два белка, копреципитирующих с LPAP: CD45 и CD71. Эти же белки были обнаружены методом co-IP/MS, который в качестве дополнительных партнеров позволил выявить такие белки, как CD98, моэзин и некоторые другие компоненты цитоскелета. Эти белки частично соответствовали определенным ранее в комплексе, образованном молекулой CD4 (Кротов и соавт. 2007). В этом комплексе CD71 напрямую взаимодействует с CD45, поэтому весьма вероятно, что этот белок

образует комплекс с LPAP не напрямую, а через молекулу CD45. Наконец, среди потенциальных белков-партнеров LPAP нами обнаружены переносчик аминокислот SLC1A4 и белок HS1 (Hematopoietic lineage cell-specific protein), который регулирует полимеризацию актина при активации лимфоцитов. С помощью альтернативного подхода Blue-Native PAGE, не включающего стадию иммунопреципитации, нам удалось детектировать один комплекс с участием белка LPAP, в состав которого входит CD45.

3. Изучение роли взаимодействия LPAP с фосфатазой CD45

3.1. Уровень экспрессии белка LPAP падает в отсутствие CD45

Чтобы исследовать взаимосвязь между экспрессией белков LPAP и CD45, мы нокаутировали CD45 в двух Т-клеточных линиях CEM и Jurkat. Это привело к падению уровня LPAP в обеих линиях до 10% (Рис. 11 А,Б).

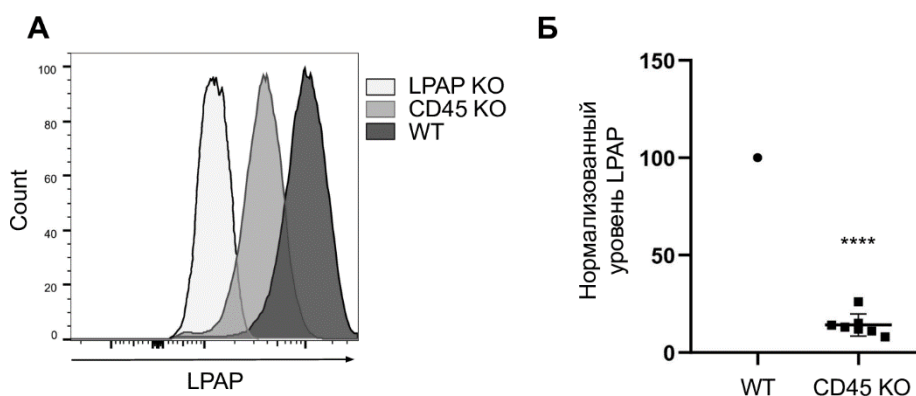


Рис. 11. Экспрессия LPAP снижается при нокаутировании CD45. (А) Уровень белка LPAP в клетках Jurkat WT и Jurkat CD45 KO анализировали с помощью проточной цитометрии. Клетки фиксировали, пермеабилizировали и окрашивали антителом против LPAP, меченным Alexa-594. Количественный обсчет по результатам 7 экспериментов приведен в (Б). Нормализованный уровень экспрессии LPAP в клетках CD45 KO сравнивали со значением 100 с помощью одновыборочного t-критерия, **** $p < 0.0001$.

3.2. Уровень белка CD45 падает при нокаутировании LPAP

На следующем этапе был поставлен вопрос, изменится ли уровень CD45 в клетках без белка LPAP. Для этого с помощью технологии CRISPR/Cas9 и последующего клонирования было получено несколько моноклональных культур Jurkat LPAP KO. Во всех этих культурах экспрессия CD45 оказалась сниженной и в среднем

составила 30% от уровня дикого типа (Рис. 12А). Столь сильного снижения экспрессии не наблюдалось для двух «посторонних» белков CD59 и CD98.

Принимая во внимание гетерогенность культуры Jurkat и сопряженной с этим вариабельности отдельных клонов, с помощью метода SORTS (Zotova et al. 2019) мы получили поликлональную культуру Jurkat, нокаутную по гену LPAP, названную нами Jurkat КЮ. Уровень CD45 в этих клетках составлял 37% от уровня CD45 в клетках дикого типа (Рис. 12Б), в то время как экспрессия посторонних белков CD59 и CD98 изменялась не столь значительно.

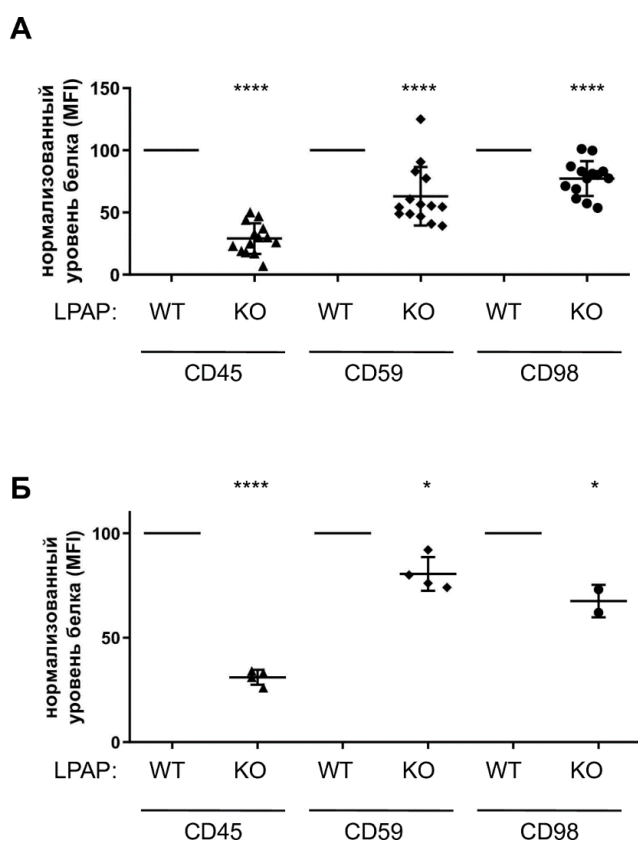


Рис. 12. Экспрессия CD45 снижается при нокаутировании LPAP. Уровень белков CD45, CD59 и CD98 определяли в клонах LPAP КО (А) или в поликлональной популяции Jurkat LPAP КЮ (Б) с помощью проточной цитометрии. CD45 и CD59 окрашивали антителами, напрямую меченными Alexa-594, для детекции CD98 использовали первичные антитела против CD98 и вторичные SHAM-FITC. Нормализованные уровни экспрессии белков в клетках LPAP КО сравнивали с контрольным значением 100 с помощью одновыборочного t-критерия. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

3.3. Экспрессия CD45 коррелирует с уровнем белка LPAP в клетках Jurkat

Обнаружив, что нокаутирование LPAP приводит к падению уровня CD45, мы решили выяснить, способно ли восстановление уровня LPAP повысить экспрессию фосфатазы. С этой целью мы выбрали один из клонов Jurkat LPAP KO и с помощью стабильной трансфекции ввели в него LPAP WT. Затем полученную популяцию клонировали и оценили экспрессию белков LPAP и CD45 с помощью проточной цитометрии. В серии клонов уровень LPAP коррелировал с уровнем CD45, чего не наблюдалось для постороннего белка CD98 (Рис. 13 А,Б).

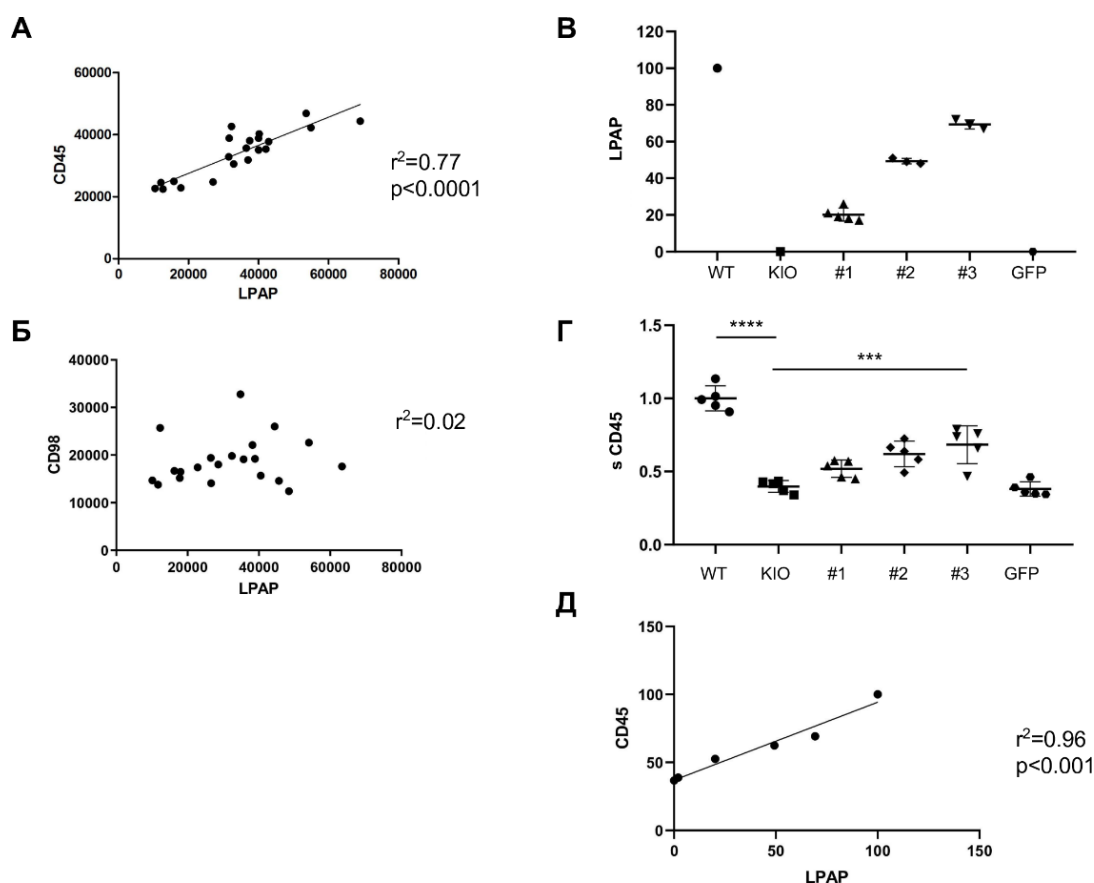


Рис. 13. Уровень CD45 коррелирует с уровнем белка LPAP. Корреляция между уровнями LPAP и CD45 (А) или CD98 (Б) в клонах Jurkat LPAP KO, стабильно трансфицированных LPAP WT. Уровень LPAP (В) и CD45 (Г) на клетках Jurkat KIO, стабильно трансфицированных различной дозой вируса, несущего LPAP WT (#1, #2, #3) или GFP. Значения MFI нормализованы относительно среднего значения для Jurkat после вычитания фонового уровня в клетках Jurkat CD45 KO; приведены индивидуальные значения, среднее±SD. Для сравнения уровня CD45 в клетках KIO и трансдуцентах использовали метод ANOVA с post hoc анализом с помощью теста

Тьюки. $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$. Средние значения для уровня LPAP и CD45 из (Г) использованы для расчета корреляции (Д). Уровень белков LPAP, CD45 и CD98 определяли с помощью проточной цитометрии на живых клетках с антителами, меченными Alexa-594. LPAP детектировали на фиксированных и пермеабелизованных клетках с антителами, меченными Alexa-594.

Поскольку описанный результат был показан на клетках, полученных из единственного клона Jurkat, и мог быть обусловлен особенностями выбранного клона, мы решили подкрепить его с помощью данных по поликлональной популяции. Для этого в клетки Jurkat К10 путем лентивирусной трансдукции был введен ген, кодирующий LPAP WT, или ген GFP в случае контроля. После этого в полученных культурах анализировали экспрессию LPAP и CD45 с помощью проточной цитометрии. При увеличении уровня LPAP (Рис. 15В), количество CD45 в клетках также возрастало (Рис. Г,Д).

ВЫВОДЫ

1. Обнаружена новая протеоформа белка LPAP, существующая только в активированных лимфоцитах. С помощью направленного мутагенеза и масс-спектрометрии было установлено, что ее образование связано с фосфорилированием LPAP по Ser-163. Получены моноклональные антитела, специфичные к белку LPAP, фосфорилированному по Ser-163.
2. При активации лимфоцитов под действием фоболмиристатацетата или путем кросс-линкирования TCR или BCR, а также под действием ионофоров и тапсигаргина происходит быстрое дефосфорилирование LPAP по Ser-172, частичное дефосфорилирование по Ser-99 и более медленное фосфорилирование по Ser-163. Фосфорилирование сайта Ser-153 при активации сохраняется. Подобные изменения статуса фосфорилирования LPAP наблюдаются в Т-клеточных линиях Jurkat и CEM, в В-клетках Daudi, а также в первичных лимфоцитах.
3. В клетках Jurkat сигнальный путь с участием PKC, Raf, MEK и ERK1/2 приводит к фосфорилированию LPAP по Ser-163. Наиболее дистальной молекулой, которая определяет это событие, является ERK1/2. С помощью *in vitro* киназного теста показано, что ERK1 может напрямую фосфорилировать LPAP по Ser-163.
4. Поиск белковых взаимодействий в клеточных линиях CEM и Jurkat с помощью ряда протеомных методов позволил выделить единственного партнера LPAP – фосфатазу CD45, с которой LPAP образует прочный комплекс в соотношении 1:1.
5. Экспрессия CD45 и LPAP в клетках Jurkat взаимосвязана: в отсутствие CD45 уровень LPAP составляет 10% от уровня дикого типа; в отсутствие LPAP уровень CD45 падает до 30%. При восстановлении экспрессии LPAP уровень CD45 повышается пропорциональным образом. Возможной функцией LPAP является контроль экспрессии CD45.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science:

1. Filatov A., Kruglova N., Meshkova T., Mazurov D. Lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein proteoforms analyzed using monoclonal antibodies // Clin. Transl. Immunol. 2015. Vol. 4, № 10. P. e44. Импакт-фактор (WoS) – 7.271.

2. **Kruglova N.A.**, Meshkova T.D., Kopylov A.T., Mazurov D.V., Filatov A.V. Constitutive and activation-dependent phosphorylation of lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein (LPAP). // PLoS One. 2017. Vol. 12, № 8. P. e0182468. Импакт-фактор (WoS) – 2.776.
3. Цой Т.В., **Круглова Н.А.**, Филатов А.В. Фосфатазо-ассоциированный фосфопротеин является субстратом протеинкиназы CK2 // Биохимия. 2018. Том. 83, № 11. с. 1698–1707. Импакт-фактор (WoS) – 1.886.
4. **Круглова Н.А.**, Копылов А.Т., Филатов А.В. Поиск молекулярных партнеров ассоциированного с фосфатазой фосфопротеина (LPAP), участвующих в активации лимфоцитов человека // Молекулярная биология. 2019. Том. 53, № 5, с.838-848. Импакт-фактор (WoS) – 0.977.

Тезисы конференций:

1. **Natalia Kruglova**, Tatiana Tsoy, Maria Byazrova 10th EFIS/EJI South East European Immunology School (SEEIS2018), Armenia, Yerevan, 19-22 October 2018. Опубликовано в сборнике тезисов, р 25.
2. **Natalia Kruglova**, Tatiana Tsoy, Maria Byazrova, Alexander Filatov (2018) Is LPAP a signaling molecule? EMBO Conference «Lymphocyte Antigen Receptor Signalling», Italy, Siena, 25-29 August 2018. Опубликовано в сборнике тезисов, р 45.
3. **Kruglova N.**, Meshkova T., Kopylov A., Mazurov D., Filatov A. (2017) The phosphorylation status of lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein (LPAP) changes dynamically upon lymphocyte activation. 42nd FEBS Congress, From Molecules to Cells and Back, Jerusalem, Israel, 10-14 September 2017. Опубликовано в сборнике The FEBS Journal 284 (Suppl. 1) 2017, p348, abstract № PP.5.4-005.
4. А. В. Филатов, **Н. А. Круглова**, Т. Д. Мешкова, Д. В. Мазуров (2017) Участие лимфоцитарного фосфатазо-ассоциированного фосфопротеина в активации лимфоцитов. Медицинская иммунология. т. 19, № спецвыпуск. с. 66–67.
5. **Н.А. Круглова**, А.Т. Копылов, Т.Д. Мешкова, А.В. Филатов. (2017) Таргетная протеомика лимфоцитарного фосфатазо-ассоциированного фосфопротеина (LPAP). Научные труды. Объединенный научный форум. Международная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Ю.А.Овчинникова», VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» Москва, 18 – 22 сентября 2017. Acta Naturae, спецвыпуск, стр. 21-22.

6. **А.В. Филатов**, Н.А. Круглова, Т.Д. Мешкова, М.Г. Завьялова, А.Т. Копылов, Д.В. Мазуров (2016) Лимфоцитарный фосфатазоассоциированный фосфопротеин (LPAP) – трансмембранный белок с неизвестной функцией. V Съезд биохимиков России, Сочи–Дагомыс, Россия 4–9 октября 2016. Acta Naturae 2016, том 2, стр. 164-165.
7. **Kruglova N.A.**, Meshkova T.D., Filatov A.V. (2016) Proteoforms of lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein. Biomembranes 2016, Долгопрудный, Россия, 26-30 сентября 2016. Опубликовано в сборнике BIOMEMBRANES 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases, Book of Abstracts, p115.
8. **Круглова Н.А.**, Мешкова Т.Д. (2016) Исследование протеоформ Лимфоцитарного Фосфатазо-Ассоциированного Фосфопротеина. XV научная конференция молодых ученых «Иммунология сегодня: традиции и инновации», ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Россия, 22 апреля 2016, в сборнике материалов конференции с.8.