

УДК 577.152.34+57.083.3

ФОРМИРОВАНИЕ ИММУННЫХ ПРОТЕАСОМ И РАЗВИТИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ¹

© 2007 г. Н. П. Шарова, Т. М. Астахова, Л. А. Бондарева*, С. Б. Дмитриева, С. Д. Столяров

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: npsharova@bk.ru

**Институт биологии Карельского НЦ РАН*

185610 Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11

E-mail: bondareva@bio.krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 22.05.06 г.

Окончательный вариант 04.07.06 г.

Рассматриваются современные представления о строении иммунных протеасом и их роли в иммунном ответе. Основное внимание уделяется вопросу формирования иммунных протеасом во вторичных лимфоидных и нелимфоидных органах в онтогенезе млекопитающих. Обсуждаются причины неэффективного функционирования иммунной системы в раннем постнатальном развитии.

Ключевые слова: иммунные протеасомы, Т-клеточный иммунитет, развитие иммунной системы.

ИММУННЫЕ ПРОТЕАСОМЫ И ИХ РОЛЬ В ИММУННОМ ОТВЕТЕ

Клетки млекопитающих содержат множественные формы протеасом, которые различаются субъединичным составом, субстратной специфичностью и функциями. Все многообразие этих форм можно свести к двум основным пулам протеасом – 26S и 20S (рис.1). К первому относятся собственно 26S-протеасомы, состоящие из протеолитического 20S-“ядра” и двух регуляторных 19S-субчастиц, и смешанные протеасомы, у которых одна из 19S-субчастиц замещена на другой регулятор (РА28, РА200). Пул 26S-протеасом осуществляет АТФ-зависимый гидролиз убиквитинированных белков и таким образом регулирует многочисленные клеточные процессы, в которых эти белки участвуют (Rock, Goldberg, 1999; Абрамова и др., 2002). Пул 20S-протеасом уничтожает белки, поврежденные окислением, независимо от убиквитина и АТФ.

В свою очередь, по набору протеолитически активных субъединиц пулы 26S-и 20S-протеасом млекопитающих можно разделить на две группы – конститутивные и иммунные (Шарова, 2006). Иммунные протеасомы содержат каталитические субъединицы LMP7 ($\beta 5i$), LMP2 ($\beta 1i$) и MECL1 ($\beta 2i$), индуцируемые γ -интерфероном, вместо каталитических субъединиц X ($\beta 5$), Y ($\beta 1$) и Z ($\beta 2$)

конститутивных протеасом. Замена конститутивных субъединиц на иммунные происходит в процессе сборки новых протеасом. Причем субъединицы LMP2 и MECL1 встраиваются совместно, но независимо от LMP7. Включение субъединицы LMP7 во вновь образующуюся протеасому, хотя и облегчается наличием LMP2 и MECL1, но может осуществляться и в их отсутствие (Groettrup et al., 1997; Griffin et al., 1998). Таким образом формируются три субтипа иммунных протеасом: содержащий все γ -интерферониндуцируемые каталитические

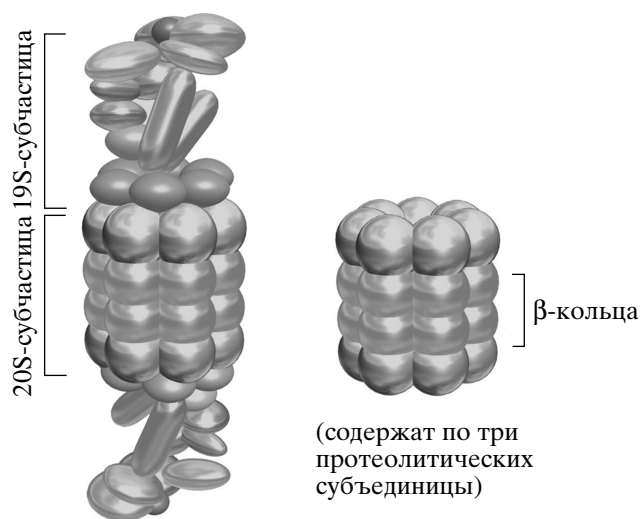


Рис. 1. Схема строения 26S- и 20S-протеасом.

¹ Работа написана по материалам доклада на конференции “Молекулярные механизмы процессов онтогенеза: эмбриогенез, геномы, эволюция”, посвященной 80-летию со дня рождения А.А. Нейфаха, и поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 06-04-48229).



Рис. 2. Типы иммунного ответа.

ские субъединицы; содержащий субъединицы LMP2 и MECL1; и обладающий только субъединицами LMP7, которые выявлены в ряде органов млекопитающих (Dahlmann et al., 2000, 2001; Астахова, Шарова 2006).

Если рассматривать иммунитет в целом, то можно сказать, что функции иммунных протеасом связаны с Т-клеточным иммунным ответом (рис. 2). Для полноценного иммунного ответа необходимо наличие иммунных протеасом не только в лимфоидных органах, но и в клетках всех тканей и органов, за исключением головного мозга. Чтобы прояснить роль иммунных протеасом, рассмотрим структурную организацию иммунной системы млекопитающих.

Созревая в центральных органах иммунной системы – костном мозгу и тимусе соответственно, В- и Т-лимфоциты мигрируют в периферические лим-

фоидные органы: селезенку, лимфатические узлы, миндалины, аппендикс, лимфоидную ткань слизистых оболочек и в лимфоидную ткань, ассоциированную с кожей (Ярилин, 1999; Галактионов, 2004; рис. 3). Периодически лимфоциты поступают из этих органов в кровь и лимфу, контролируя таким образом весь организм на наличие источников агрессии, и возвращаются вновь в лимфоидные органы. При этом наибольшей интенсивностью рециркуляции отличаются Т-лимфоциты, обеспечивающие клеточный иммунный ответ. Цитотоксические Т-лимфоциты (Т-киллеры) распознают сигналы на дефектных клетках-мишенях, синтезирующих вирусные или свои мутантные белки, и уничтожают такие клетки.

Запуск сигналов о дефектности клетки (наличии в ней источника агрессии) осуществляют иммунные протеасомы. Это происходит следующим образом.



Рис. 3. Структура организации иммунной системы.

Синтезирующиеся в клетке аномальные и чужеродные белки подвергаются протеолизу иммунными 26S-протеасомами по АТФ- и убиквитинзависимому пути с образованием потенциальных антигенных олигопептидов с “правильным” С-концом, содержащим остатки гидрофобных аминокислот или аргинина (Shimbara et al., 1997; Cascio et al., 2001; Toes et al., 2001). Антигенные олигопептиды длиной 8–11 аминокислотных остатков являются, как правило, антигенными эпитопами. Более длинные антигенные олигопептиды, образуемые иммунными протеасомами, укорачиваются до нужной длины под действием аминоклептидаз. Антигенные олигопептиды длиной 8–11 аминокислотных остатков соединяются в цитоплазме с белками-транспортерами (TAP1 и TAP2, Transporter Associated with Antigen Presentation), переносятся в эндоплазматическую сеть, где связываются с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) класса I, и выносятся вместе с ними на поверхность клетки в составе трансмембранных пузырьков (Janeway, Travers, 1994; Rock, Goldberg, 1999; Ярилин, 1999;

Галактионов, 2004). Эта структура служит сигналом для Т-киллеров о необходимости уничтожить дефектную клетку.

В антигенпредставляющих клетках (АПК) иммунной системы на иммунные протеасомы ложится дополнительная нагрузка. Антигены, поступающие в лимфоидные органы с током крови и лимфы, поглощаются АПК путем эндоцитоза, поступают в цитоплазму из эндоцитозных пузырьков и с помощью иммунных протеасом превращаются в антигенные эпитопы, которые выносятся на поверхность клетки в комплексе с молекулами ГКГ класса I так же, как и в дефектных клетках, подлежащих уничтожению (Rock, Goldberg, 1999). Однако, в отличие от последних, роль АПК заключается не в запуске сигнала на собственное уничтожение, а в активации наивных Т-CD8⁺-лимфоцитов, которые пролиферируют и образуют клоны дифференцированных Т-киллеров, специфичных в отношении определенных антигенных эпитопов. Существовало мнение, что любая зараженная клетка

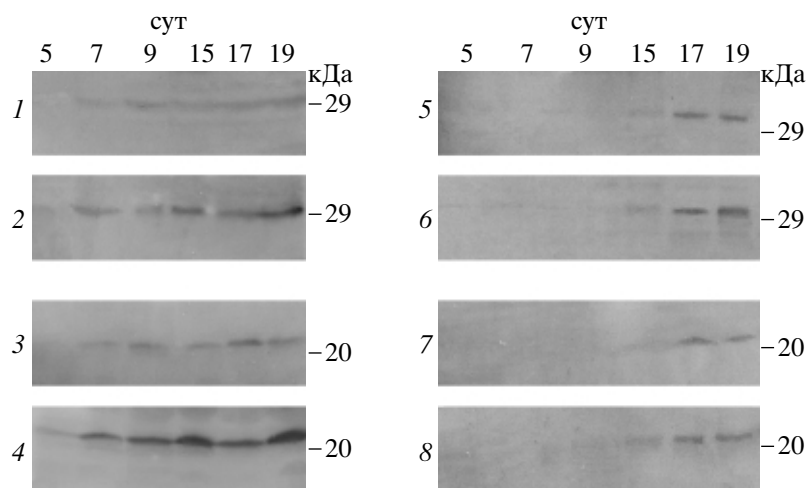


Рис. 4. Результаты Вестерн-блоттинга белков фракций 26S-протеасом (1, 3, 5, 7) и 20S-протеасом (2, 4, 6, 8), полученных из селезенки (1–4) и печени (5–8) крыс разного возраста.

Использованы поликлональные антитела к субъединицам LMP7 (1, 2, 5, 6) и LMP2 (3, 4, 7, 8). Маркеры: карбоангидраза (молекуляр.масса 29 кДа), ингибитор трипсина (молекуляр.масса 20 кДа).

может активировать T-CD8⁺-лимфоциты благодаря способности представлять им антигенные эпитопы, однако впоследствии было доказано, что оно ошибочно. Оказалось, что для полноценной активации наивного T-CD8⁺-лимфоцита (помимо взаимодействия его рецептора и корецептора CD8 с комплексом молекул ГКГ класса I и антигенного олигопептида) требуется также взаимодействие его корецептора CD28 с молекулой CD80, имеющейся только у АПК (Ярилин, 1999; Галактионов, 2004).

В тимусе – первичном лимфоидном органе – иммунные протеасомы участвуют в отрицательной селекции тимоцитов (Nil et al., 2004). В АПК тимуса иммунные протеасомы расщепляют не чужеродные, а свои белки и образуют из них антигенные эпитопы, которые выносятся на поверхность в комплексах с молекулами ГКГ класса I для выявления и последующей выбраковки тимоцитов, проявляющих высокое сродство к таким комплексам.

Можно подытожить, что адаптивный иммунный ответ у млекопитающих невозможен без присутствия иммунных протеасом в различных органах и тканях.

ФОРМИРОВАНИЕ ИММУННЫХ ПРОТЕАСОМ В ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫСЫ

Мы исследовали изменения пулов 26S- и 20S-протеасом в постнатальном развитии млекопитающих, характеризующемся существенными биохимическими и физиологическими перестройками организма, в частности динамику появления иммунных протеасом в селезенке (вторичном лимфоидном органе) и печени (к моменту рождения уже не являющейся лимфоидным органом) крысы в первые 3 нед постнатального развития. Иммунные субъеди-

ницы LMP7 и LMP2 выявляли с помощью Вестерн-блоттинга с использованием поликлональных антител к этим субъединицам (рис. 4). По содержанию субъединицы LMP2 судили об уровне включающейся вместе с ней субъединицы LMP10. Предварительно разделяли пулы 26S- и 20S-протеасом селезенки и печени с помощью фракционирования сульфатом аммония (Астахова, Шарова, 2006). Этот метод позволил нам обнаружить иммунные субъединицы в обеих фракциях селезенки к концу 1-й нед. а в печени – на 3-й нед постнатального развития.

Какова динамика активности и количества пулов 26S- и 20S-протеасом в эти периоды? Активность 26S- и 20S-протеасом определяли по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC, утилизирующегося химотрипсинподобными центрами. Для того чтобы исключить вклад примесных протеолитических активностей, применяли ингибитор химотрипсинподобных центров протеасом – MG132. Окончательные расчеты проводили по разнице между полной и остаточной активностью в присутствии 5 мкМ MG132. На рис. 5 приведена динамика удельной активности пулов 26S- и 20S-протеасом в селезенке и печени крысы с 5-х по 23-и сут постнатального развития, выраженная в единицах на мг белка, содержащегося в осветленных гомогенатах селезенки и печени. Видна общая тенденция к увеличению активности как 26S-, так и 20S-протеасом в обоих исследуемых органах на 23-и сут развития по сравнению с 5-ми сут и два периода падения активности обоих пулов протеасом и в селезенке, и в печени.

Содержание 26S-протеасом в селезенке и печени на разных этапах развития оценивали с помощью Вестерн-блоттинга, используя моноклональные антитела к субъединице Rpt6, входящей в состав регуляторной субчастицы 19S. Содержание

20S-протеасом определяли тем же методом, используя моноклональные антитела к субъединицам $\alpha 1-7$, формирующим α -кольца. После выявления специфических полос на рентгеновской пленке с помощью стандартной реакции хемилюминесценции определяли их плотность и рассчитывали ее на мг белка осветленных гомогенатов. Динамика содержания 26S-протеасом в селезенке и печени крысы в постнатальном развитии имеет сходство с таковой их удельной активности: периоды падения активности и содержания протеасом совпадают, однако строгой корреляции между этими величинами не наблюдается. Иная картина выявлена для 20S-протеасом: их содержание и в селезенке, и в печени не имеет достоверных различий на разных этапах развития.

Очевидно, что параллельное падение активности и содержания 26S-протеасом – результат истощения запасенных пулов, которое начинается на 7-е постнатальные сут, и в это же время во фракции 26S-протеасом селезенки появляются иммунные субъединицы. Иначе говоря, на 7-е сут происходит и обратный процесс – формирование новых пулов 26S-протеасом, причем в селезенке это уже качественно иной пул, включающий в себя иммунные субъединицы, в то время как в печени вновь образуется пул конститутивных 26S-протеасом. Через 12 сут (на 19-е постнатальные сут) начинается следующий период смены пулов, который сопровождается падением активности и содержания в них 26S-протеасом, а также появлением иммунных субъединиц в печени. Отметим, что время полужизни протеасом составляет 12–15 сут (Tanaka, Ichihara, 1989), что согласуется с полученными нами результатами. Отсутствие строгой корреляции между динамикой удельной активности и величиной пулов 26S-протеасом можно объяснить одновременным осуществлением нескольких процессов – устранением старых и формированием новых пулов, изменением их субъединичного состава, действием регуляторных белков. Так, например, известно, что замена конститутивных каталитических субъединиц на иммунные сопровождается изменением активности протеасом (Eleuteri et al., 1997; Астахова, Шарова, 2006).

Смена пулов 20S-протеасом в селезенке и печени крысы в постнатальном развитии, по всей видимости, происходит одновременно со сменой пулов 26S-протеасом, о чем свидетельствует сходная динамика их активности и появления в них иммунных субъединиц. Отсутствие видимого изменения содержания 20S-протеасом не противоречит этому предположению и объясняется особенностями их сборки: формирование 20S-протеасом начинается с образования их неактивных предшественников (Rock, Goldberg, 1999). В целом разная динамика величины пулов 26S- и 20S-протеасом в ходе развития отражает разницу в механизмах их формирования: если 20S-протеасомы собираются последовательно из отдельных субъединиц, то 26S-протеасомы обра-

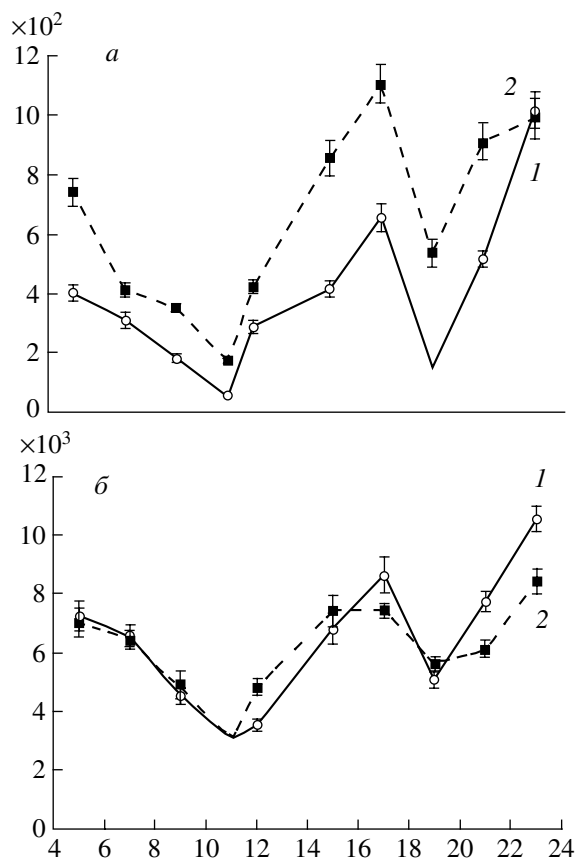


Рис. 5. Удельная активность пулов протеасом 26S (а) и 20S (б) (по оси абсцисс, ед/мг), выделенных из селезенки (1) и печени (2) крыс разного возраста (по оси ординат, сут); $p < 0.05$.

зуются из готовых 20S- и 19S-субчастиц. Отметим, что наличием иммунных субъединиц 20S-протеасомы селезенки и печени крысы отличаются от 20S-протеасом различных органов мыши (Астахова, Шарова, 2006). По-видимому, иммунные 20S-протеасомы образуют резерв в органах крысы, который при необходимости может превращаться в функциональные 26S-протеасомы, способные участвовать в иммунном ответе.

РАЗВИТИЕ БЕЛОЙ ПУЛЬПЫ СЕЛЕЗЕНКИ В ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫСЫ

Параллельно с изучением динамики формирования иммунных протеасом в селезенке и печени крысы мы исследовали развитие белой пульпы селезенки. Нас интересовало развитие периартериальных лимфоидных оболочек (муфт), которые представляют собой функциональные зоны Т-лимфоцитов. Срезы селезенки обрабатывали гематоксилин-эозином. Гематоксилин окрашивает ядра клеток в синий, а эозин – цитоплазму в розовый цвет. Это позволяет различать лимфоциты, обладающие крупными ядрами, среди всего многообразия кле-

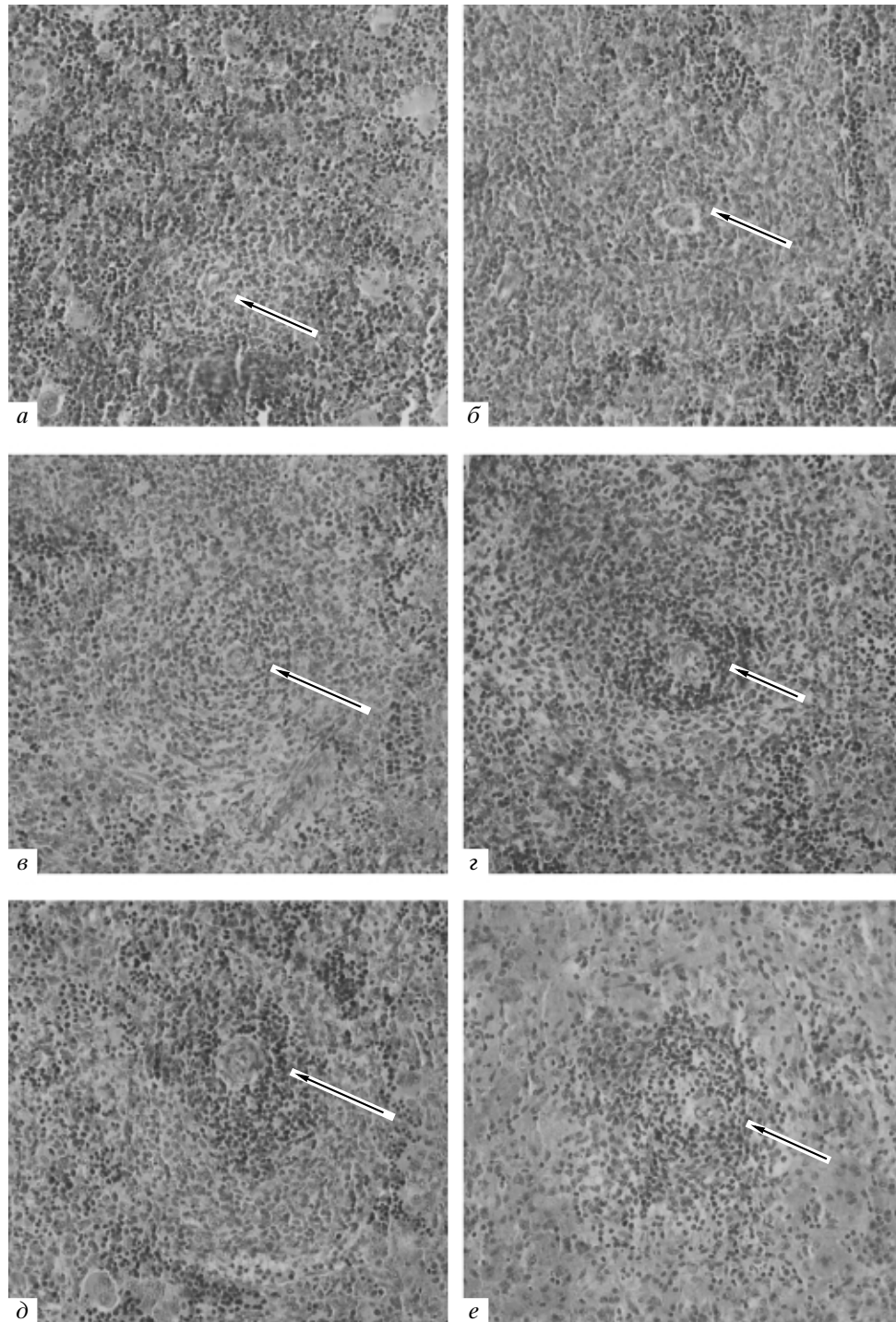


Рис. 6. Развитие белой пульпы селезенки крысы на разных сроках развития, сут: *a* – 5-е, *б* – 9-е, *в* – 11-е, *г* – 15-е, *д* – 18-е, *е* – взрослые животные. Окраска гематоксилин-эозином. Стрелками показаны зоны периартериальных лимфоидных оболочек. Увел. $\times 10$.

ток селезенки. На рис. 6 представлены фотографии срезов селезенки в черно-белом варианте. Лимфоциты выглядят на них как круглые темные клетки. На ранних стадиях развития Т- и В-лимфоциты в селезенке перемешаны, но в 1-е постнатальные сут растет количество зон концентрически располо-

женных клеток стромы в периартериальном пространстве белой пульпы, куда постепенно мигрируют Т-лимфоциты (Van Rees et al., 1990). Четко выраженные муфты вокруг артериол образуются к 15–18-м сут постнатального развития (рис. 6), что приблизительно совпадает по времени с формировани-

ем иммунных протеасом в печени (17–19-е сут, рис. 4). Иными словами, при возникновении дефектных клеток в печени Т-киллеры, мигрируя из селезенки с током крови, могут уничтожать эти клетки к 17–19-м сут постнатального развития.

Селезенка, по всей видимости, готова к Т-клеточному иммунному ответу внутри самой себя на более ранних этапах – к концу первой недели после рождения, когда в ней формируются иммунные протеасомы и уже присутствуют Т-лимфоциты и другие клетки иммунной системы. Способность организма к более раннему обеспечению иммунной защиты селезенки как органа иммунной системы представляется важной для становления иммунитета в целом. Однако остается открытым вопрос: во всех ли клетках селезенки в этот период появляются иммунные протеасомы или только в АПК? Ответ на этот вопрос мы надеемся получить в дальнейших исследованиях.

Наша работа позволяет понять, почему в раннем постнатальном развитии млекопитающих иммунная система не функционирует эффективно, и открывает новые перспективы в исследовании развития иммунной системы в онтогенезе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абрамова Е.Б., Шарова Н.П., Карнов В.Л. Протеасома: разрушать, чтобы жить // Молекуляр. биология. 2002. Т. 36. № 5. С. 761–776.
- Астахова Т.М., Шарова Н.П. Исключение иммунных протеасом из клеток асцитной карциномы Krebs-II мыши // Изв. РАН. Сер. биол. 2006. № 3. С. 275–283.
- Галактионов В.Г. Иммунология. М.: Академия, 2004. 523 с.
- Шарова Н.П. Иммунные протеасомы и иммунитет // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 3. С. 111–118.
- Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: Медицина, 1999. 607 с.
- Cascio P., Hilton C., Kisselev A.F. et al. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide // EMBO J. 2001. V. 20. P. 2357–2366.
- Dahlmann B., Ruppert T., Kuehn L. et al. Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties // J. Mol. Biol. 2000. V. 303. P. 643–653.
- Dahlmann B., Ruppert T., Kloetzel P.M. et al. Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle // Biochimie. 2001. V. 83. P. 295–299.
- Eleuteri A.M., Kohanski R.A., Cardozo C., Orlowski M. Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by LMP7, LMP2, and MECL1 and changes in properties and specificity // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 11824–11831.
- Griffin T.A., Nandi D., Cruz M. et al. Immunoproteasome assembly. Cooperative incorporation of interferon γ (IFN- γ)-inducible subunits // J. Exp. Med. 1998. V. 187. P. 97–104.
- Groettrup M., Standera S., Stohwasser R. et al. The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 8970–8975.
- Janeway D.A., Travers P. Immunobiology. The immune system in health and disease. L. et al.: Cur. Biol. Ltd.; Garland Publ. Inc., 1994. G: 19 p.
- Nil A., Firat E., Sobek V. et al. Expression of housekeeping and immunoproteasome subunit genes is differentially regulated in positively and negatively selecting thymic stroma subsets // Eur. J. Immunol. 2004. V. 34. P. 2681–2689.
- Rock K.L., Goldberg A.L. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides // Annu. Rev. Immunol. 1999. V. 17. P. 739–779.
- Shimbara N., Nakajima H., Tanahashi N. et al. Double-cleavage production of the CTL epitope by proteasome and PA28: role of the franking region // Genes Cells. 1997. V. 2. P. 785–800.
- Tanaka K., Ichihara A. Half-life of proteasomes (multiprotease complexes) in rat liver // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989. V. 159. P. 1309–1315.
- Toes R.E.M., Nussbaum A.K., Degermann S. et al. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products // J. Exp. Med. 2001. V. 194. P. 1–12.
- Van Rees E.P., Dijkstra C.D., Sminia T. Ontogeny of the rat immune system: an immunohistochemical approach // Devel. Comp. Immunol. 1990. V. 14. P. 9–18.

Formation of Immune Proteasomes and Development of Immune System in Ontogenesis of Mammals

© 2007 г. N. P. Sharova*, T. M. Astakhova*, L. A. Bondareva**, S. B. Dmitrieva*, and S. D. Stolyarov*

*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia
E-mail: npsharova@bk.ru

**Institute of Biology, Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences, Pushkinskaya ul., 11, Petrozavodsk, 185610 Russia; E-mail: bondareva@bio.ktc.karelia.ru

Received May 22, 2006; in final form July 04, 2006

Abstract—Current concepts of the structure of immune proteasomes and their role in immune response have been considered. The main attention has been paid to the formation of immune proteasomes in secondary lymphoid and nonlymphoid organs during ontogenesis of mammals. The causes of ineffective formation of immune system in early postnatal development have been discussed.