

Изучение взаимодействия IL-4 и IL-4δ2 с рецепторами IL-4R I и II типов *in silico* и их эффектов на функциональную активность моноклеарных клеток *in vitro*

Горемыкин К.В.¹, Силков А.Н.², Шилов Б.В.¹, Серебров В.Ю.¹, Сазонов А.Э.¹, Сенников С.В.²

Study of the IL-4 and IL-4δ2 interaction with the IL-4R receptors of the I and II types *in silico* and the effect on the functional activity of mononuclear cells *in vitro*

Goremykin K.V., Silkov A.N., Shilov B.V., Serebrov V.Yu., Sazonov A.E., Sennikov S.V.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² НИИ клинической иммунологии СО РАН, г. Новосибирск

© Горемыкин К.В., Силков А.Н., Шилов Б.В. и др.

Исследование продуктов альтернативного сплайсинга цитокинов представляет значительный научный интерес. Продукт альтернативного сплайсинга интерлейкина-4 (IL-4) — IL-4δ2 обладает антагонистическим по сравнению с IL-4 действием на пролиферативную активность моноклеарных клеток крови человека и продукцию ими IL-6.

Сочетание биохимических и компьютерных методов исследования позволило подтвердить и объяснить наличие у IL-4δ2 свойств антагониста по отношению к своему полноразмерному варианту — IL-4.

Ключевые слова: IL-4δ2, IL-4, AutoDock, моноклеарные клетки крови, В-лимфоциты.

Alternatively spliced interleukins are very actively studied over the last years. Splice form of IL-4 — IL-4δ2 has antagonistic effects to its full form on proliferative activity of human mononuclear blood cells and their IL-6 production.

Antagonistic effects between IL-4 and IL-4δ2 were confirmed and explained in this study due to combination of biochemical and computer methods.

Key words: IL-4δ2, IL-4, AutoDock, mononuclear blood cells, B-lymphocytes.

УДК 578.245:577.152]:57.085.2

Введение

Интерлейкин-4 (IL-4) вовлечен в онтогенез В-лимфоцитов: вызывает их активацию, пролиферацию и дифференцировку [12]. В Т-клетках IL-4 переключает дифференцировку Т-хелперов типа 0 в сторону Т-хелперов типа 2, усиливает экспрессию IL-4R.

Широкий спектр эффектов, оказываемых IL-4 на различные клетки, опосредуется двумя вариантами рецептора IL-4 (IL-4R), состоящими из трех видов субъединиц: IL-4Rα, IL-2Rγ и IL-13Rα.

Субъединица IL-2Rγ, или белок γ_c, является общим компонентом для рецепторов IL-2, IL-4, IL-7 и

некоторых других. Объединяясь, IL-4Rα и γ_c формируют IL-4R I — высокоаффинный рецептор первого типа, который экспрессируется на поверхности широкого спектра иммунокомпетентных и гемопоэтических клеток: Т- и В-лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов [16].

Второй тип рецептора к IL-4 — IL-4R II формируется субъединицами IL-13Rα и IL-4Rα. IL-4R II является низкоаффинным, экспрессируется преимущественно на поверхности клеток нелимфоидного происхождения и может связывать как IL-4, так и IL-13. Предполагается, что данное явление обеспечивает известное перекрытие эффектов этих цитокинов

[10]. В список иммунопатологических состояний, в которых IL-4 играет важную роль, включены аллергические (атопическая астма, ринит) [17], аутоиммунные (ревматоидный артрит, системный склероз) болезни [8], а также некоторые хронические инфекции [18].

В последние несколько лет обозначилось новое направление в исследованиях цитокинов, связанное с изучением изоформ как самих цитокинов, так и их рецепторов, образующихся при альтернативном сплайсинге транскриптов. Альтернативный сплайсинг активно участвует в формировании полиморфизма системы цитокиновой регуляции, а сплайс-изоформы белков цитокинов и их рецепторов значительно расширяют регуляторные функции различных цитокинов, поскольку обладают свойствами, отличными (или противоположными) от полноразмерных белков. Исследования в данном направлении могут серьезно дополнить современное представление о регуляции гемо- и иммунопоэза новыми сведениями о механизмах контроля эффекторных функций цитокинов, а также предоставить клиническим иммунологам специфические биологические препараты с новыми свойствами [5].

Сказанное выше в полной мере можно отнести к сплайс-варианту IL-4 человека с делецией второго экзона — IL-4δ2. Образование IL-4δ2 имеет тканеспецифический характер, детектируется в различных типах иммунокомпетентных клеток [13].

Экспрессия мРНК IL-4δ2 обнаружена в мононуклеарных клетках периферической крови (МНКПК), в Т-лимфоцитах [4] и В-лимфоцитах [14], в клетках легких, кишечника и тимуса [7]. Кроме того, экспрессия мРНК обеих форм IL-4 обнаружена в тканях плаценты, децидуальной ткани, причем количественное соотношение двух форм мРНК в этих линиях различное [14]. Установлено, что нестимулированные МНКПК экспрессируют обе формы мРНК IL-4, при этом количество мРНК IL-4 в 3,5 раза больше, чем мРНК IL-4δ2 [3].

В экспериментах с В-лимфоцитами было показано, что IL-4δ2 проявляет себя как антагонист своего полноразмерного варианта. Действие IL-4δ2 приводит к снижению синтеза иммуноглобулина (Ig) E, опосредованного IL-4. На основании этих данных было высказано предположение, что IL-4δ2 связывается с рецептором IL-4R, но не вызывает конформационных изменений в рецепторе и не обеспечивает трансдукцию сигнала в клетку [4]. Однако оконча-

тельно механизм антагонистического действия IL-4δ2 не установлен.

Для моделирования взаимодействия биологических объектов с 70-х гг. XX в. используется вычислительная техника. В биологии и медицине компьютерное исследование принято обозначать *in silico*. Взаимодействие двух и более молекул между собой может быть смоделировано с использованием методов квантовой химии или молекулярной механики.

Молекулярная механика — это совокупность методов априорного определения геометрического строения и энергии молекул на основе модели, в которой (в отличие от методов квантовой химии) электроны системы не рассматриваются. Потенциальная энергия, которая в квантово-химических моделях подлежит прямому расчету, здесь аппроксимируется набором эмпирических функций разной степени сложности, представляющих собой, например, суммы парных потенциалов взаимодействия атомов. Такая аппроксимация позволяет экономить вычислительные ресурсы и добиваться достоверных результатов. Таким образом, является актуальным использование методов молекулярной механики для моделирования взаимодействия IL-4 и IL-4δ2 с рецепторами IL-4R I и IL-4R II.

В связи с вышеизложенным целью работы — изучить взаимодействие цитокинов IL-4 и IL-4δ2 с рецепторами IL-4R I и IL-4R II на компьютерной модели их лиганд-рецепторных взаимодействий, охарактеризовать биологическую активность рекомбинантного белка IL-4δ2 в культуре мононуклеарных клеток крови по влиянию на их пролиферативную активность, продукцию ими цитокинов.

Материал и методы

Модели IL-4, IL-4R I типа, IL-4 II типа были получены через сеть Интернет из базы данных RCSB PDB [9], где они находятся в свободном доступе. Оригинальная модель IL-4δ2, структура которого была создана на компьютере исходя из физико-химических закономерностей, предоставлена создателем — А. Денесюком (Университет Турку, Финляндия). Расчет лиганд-рецепторных взаимодействий осуществлялся при помощи программы AutoDock 4.0 в составе пакета программ MGLTools 1.4.5 [15] на суперкомпьютере Skif Cyberia в Томском государственном университете.

Источником мононуклеарных клеток (МНК) послужила гепаринизированная (50 ЕД гепарина на 1 мл крови) венозная кровь доноров. МНК выделяли стандартным методом центрифугирования на градиенте плотности фиколл-урографина. Затем МНК культивировали в среде RPMI-1640.

В работе использованы рекомбинантные человеческие белки: rhIL-4 (R & D System, Великобритания) и изоформа интерлейкина-4 — rhIL-4 δ 2, любезно предоставленная Л.Р. Птицыным (ГосНИИ «Генетика», г. Москва) [1].

Пролиферативную активность МНК оценивали по включению ³H-тимидина. Подсчет радиоактивности экспериментального материала производили в жидкостном сцинтиляционном счетчике SL-30 (Intertechnic, Франция). Результаты представляли в виде среднего счета (импульсов в минуту) из трех идентичных культур. Для исследования влияния IL-4 и IL-4 δ 2 на пролиферативную активность МНК клетки культивировали в присутствии рекомбинантных белков в системах без митогена и в присутствии субоптимальных доз митогена конканавалина А (КонА) (Pharmacia, Швеция).

Уровень цитокинов определяли в культуральной среде МНКПК после 48 ч культивирования в 24-луночных планшетах. Клетки осаждали центрифугированием, собирали кондиционную среду и хранили при температуре -20 °С до проведения анализа. Количественную оценку уровней цитокинов в кондиционных средах проводили на электрохемилюминиметре ORIGEN Analyzer (IGEN Inc., США), как описано в работе С.В. Сенникова и соавт. [19].

Полученные данные представлены как среднее выборочное значение M и стандартная ошибка среднего m . Для статистической обработки результатов культуральных исследований использовали дисперсионный анализ и критерии множественных сравнений, лиганд-рецепторных взаимодействий, непараметрический U -критерий Манна—Уитни (поскольку, по данным критерия Колмогорова—Смирнова, закон распределения полученных данных не соответствовал нормальному), с помощью программы Statistica 6.0 for Windows. Расчет показателя RMSD для оценки качества контрольного докинга выполняли в программе AutoDock.

Результаты и обсуждение

Для каждой пары лиганд — рецептор был 50 раз проведен расчет межмолекулярных взаимодействий. В рамках каждого расчета анализировались 2,5 млн различных конформаций лиганда в лиганд-связывающем центре рецептора. Из этих 2,5 млн конформаций отбиралась одна наиболее энергетически выгодная конформация, т.е. конформация с наименьшим значением изменения свободной энергии Гиббса. Таким образом, по завершении расчетов было получено 50 наилучших конформаций для каждой пары рецептор — лиганд.

В результате анализа данных были выявлены значения средней энергии связывания для каждой пары лиганд — рецептор (рис. 1).

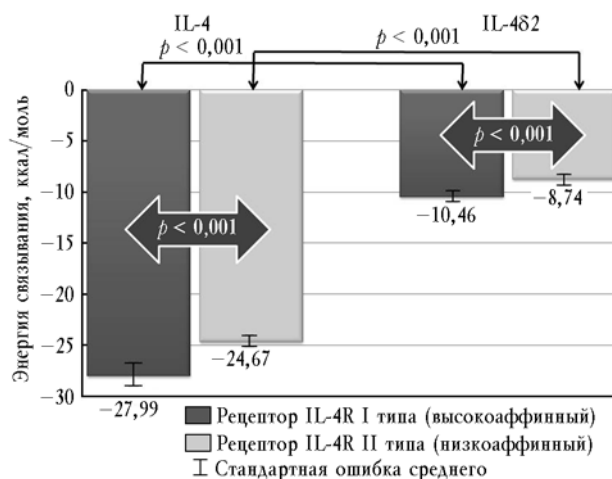


Рис. 1. Свободная энергия связывания IL-4 и IL-4 δ 2 с рецепторами IL-4R I и II типов

На основании отрицательных значений энергии связывания (рис. 1) было показано, что IL-4 δ 2 способен связываться с рецепторами обоих типов. Как и ожидалось [20], IL-4 связывался с высокоаффинным рецептором более прочно, чем с низкоаффинным. Исследование *in silico* показало, что участки, ответственные за связывание с IL-4R α — основным компонентом рецепторов обоих типов, формируют практически такую же поверхность, как и в полноразмерном варианте IL-4. Критически важные для связывания с IL-4R α аминокислоты Glu9 и Lys12 располагаются в IL-4 δ 2 практически в том же положении, что и в полноразмерном IL-4, несмотря на поворот α -спирали, в которой они расположены, на 180°.

Однако IL-4 δ 2 связывался с обоими типами рецепторов слабее ($p < 0,001$), чем полноразмерный вариант IL-4. Этот факт можно объяснить тем, что не-

достаток в кодирующей IL-4δ2 мРНК второго экзона приводит к формированию белка, отличающегося от исходной формы (IL-4) отсутствием в IL-4 петли АВ и β-складки А (располагаются между αА- и αВ-спиралями в полноразмерном варианте). Это существенно меняет поверхность сайта (включает аминокислоты Arg121 и Tyr124), ответственного за взаимодействие с IL-2Rγс и IL-13Rα — компонентами, входящими в состав IL-4R I и II типов соответственно и повышающими сродство к этим рецепторам многократно.

Кроме того, IL-4δ2 образует лишь четыре водородные связи с аминокислотами лиганд-связывающего центра IL-4R I типа. Для сравнения: IL-4 образует 11 водородных связей в лиганд-связывающем центре IL-4R I типа, в том числе посредством аминокислоты Arg121.

По причине отсутствия взаимодействия ключевых аминокислот IL-4δ2 — Arg121 и Tyr124 с добавочными цепями рецептора IL-4R I типа IL-4δ2, вероятно, не способен активировать рецептор IL-4R I типа.

При этом IL-4δ2, как и IL-4, возможно, способен активировать низкоаффинный рецептор IL-4R II типа. Это заключение можно сделать на основании того, что IL-4δ2, как и IL-4, образует большое число водородных связей в лиганд-связывающем центре IL-4R II типа, в том числе по Arg121.

Таким образом, антагонистический эффект IL-4δ2 формируется за счет конкурентного связывания с рецептором I типа без его активации.

Для подтверждения расчетов, выполненных *in silico*, были проведены молекулярно-биологические исследования действия рекомбинантных белков IL-4 и IL-4δ2 на пролиферативную активность МНКПК человека и продукцию ими некоторых цитокинов. Результаты экспериментов для оценки эффектов рекомбинантных белков на пролиферативную активность МНКПК, проведенных в 14 различных культурах, представлены на рис. 2. Введение в культуру IL-4 достоверно повышало уровень пролиферации МНКПК человека относительно нестимулированного контроля. При совместном применении IL-4 и IL-4δ2 последний отменял стимулирующее влияние IL-4 в дозозависимой манере. При этом сам IL-4δ2 не оказывал значимого влияния на пролиферативную активность МНКПК.

Поскольку IL-4 известен как эффективный костимулятор клеточной пролиферации [12], проведено исследование эффекта действия IL-4 и IL-4δ2 на пролиферативную активность МНКПК, стимулированных субоптимальными дозами митогена КонА в культуре (рис. 3). В предварительных экспериментах была определена субоптимальная доза КонА, которая составила 5 мкг/мл.

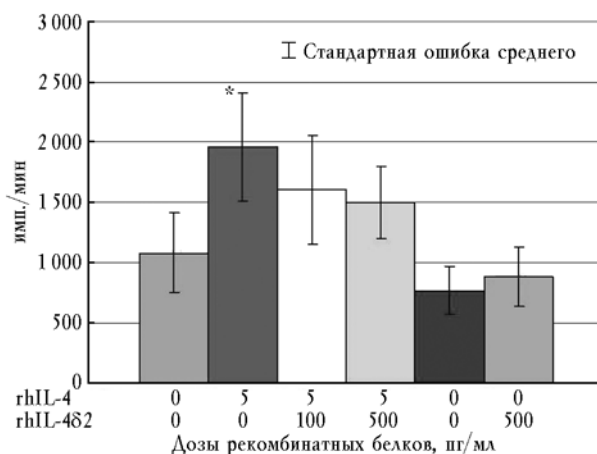


Рис. 2. Влияние rhIL-4 и rhIL-4δ2 на пролиферацию МНКПК человека. Клетки культивировали 72 ч в концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Использованные дозы рекомбинантных белков указаны под гистограммой. Результаты представлены для культур 14 доноров: * — статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,001$)

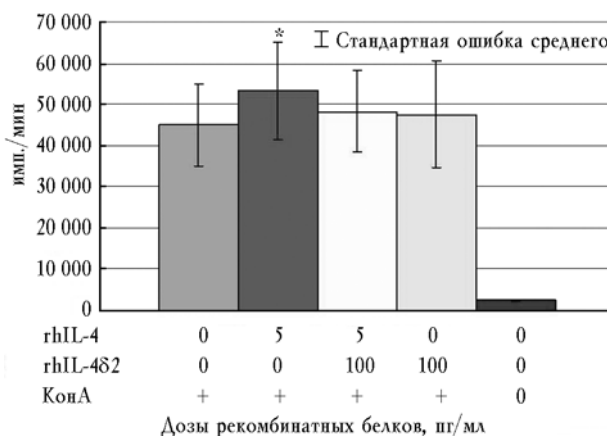


Рис. 3. Влияние rhIL-4δ2 на костимулированную пролиферацию МНКПК человека на фоне стимуляции КонА в дозе 5 мкг/мл ($n = 9$): * — статистически значимая стимуляция пролиферации ($p < 0,05$)

В представленной серии экспериментов продемонстрирован эффект действия IL-4 и IL-4δ2 на пролиферацию МНКПК, аналогичный полученному в культурах без митогенной стимуляции. IL-4 выступал

костимулятором клеточной пролиферации, а IL-4 δ 2 отменял его стимулирующий эффект, при этом не демонстрируя достоверного влияния на пролиферацию МНК. Кроме того, при использовании митогенов в культуре МНК эффекты рекомбинантных белков были менее выраженными, особенно в случае использования Т-клеточного митогена — КоА (рис. 3).

Далее было оценено влияние рекомбинантных белков IL-4 и IL-4 δ 2 на продукцию цитокинов культурой МНКПК. IL-4 является одним из ключевых цитокинов Т-хелперов типа 2 и имеет влияние на различные типы иммунокомпетентных клеток, в том числе и опосредованно, через продукцию других цитокинов. Влияние IL-4 δ 2 на продукцию цитокинов ранее не изучалось. В связи с этим проведена количественная оценка продукции цитокинов в кондиционных средах 48-часовых культур МНКПК человека, культивированных в присутствии IL-4 и (или) IL-4 δ 2. В проведенных исследованиях не обнаружено значимых эффектов IL-4 δ 2 на продукцию IL-1 β , IL-2, IL-10 и интерферона- γ .

Уровень синтеза IL-6 в культуре МНКПК достоверно понижался в присутствии IL-4, а IL-4 δ 2 дозозависимо отменял ингибиторное влияние IL-4, подтверждая тем самым гипотезу естественного антагониста (рис. 4). Следует отметить, что в противоположность результатам, полученным при исследовании пролиферативной активности клеток, в данном случае изоформа обладала выраженным стимулирующим действием на уровень секреции IL-6.

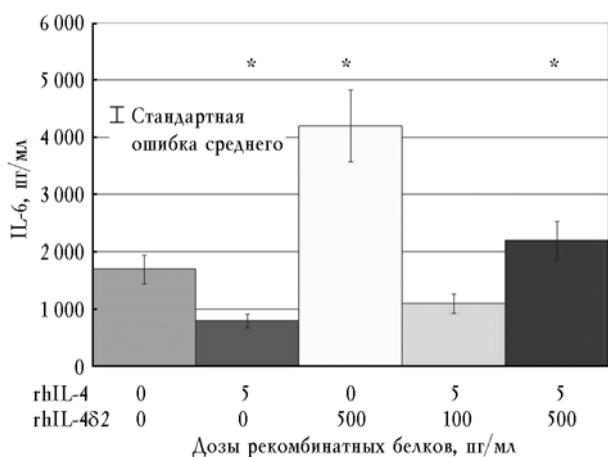


Рис. 4. Эффект rhIL-4 и rhIL-4 δ 2 на продукцию IL-6 в культуре МНКПК. Представлены результаты измерения уровня IL-6 в кондиционных средах для 20 культур МНК, полученных от разных доноров: * — статистически значимые изменения ($p < 0,001$)

Позитивная регуляция IL-4 δ 2 продукции IL-6 обнаружена впервые и не соответствует принятому в настоящий момент мнению о роли IL-4 δ 2 как антагониста полноразмерного варианта. Это явление предположительно обусловлено активацией низкоаффинных рецепторов (IL-4R II типа) в мембране МНК. Возможность активации IL-4R II типа посредством IL-4 δ 2 была показана в представленной работе в ходе компьютерного моделирования.

Заключение

По данным исследования *in silico*, IL-4 δ 2 связывается с рецепторами IL-4 как I, так и II типов, но менее прочно (свободная энергия связывания составила $-10,46$ и $-8,74$ ккал/моль соответственно), чем полноразмерный вариант ($-27,99$ и $-24,67$ ккал/моль).

Эффекты действия IL-4 в отношении пролиферативной активности культивированных мононуклеарных клеток периферической крови отменяются при внесении IL-4 δ 2, что свидетельствует о наличии у этой изоформы свойств антагониста IL-4R II типа. Дозозависимая манера IL-4 δ 2 ингибировать активность IL-4 объясняется его свойствами конкурентного ингибитора.

Установлено, что IL-4 δ 2 не только дозозависимо отменяет ингибирующее действие IL-4 на продукцию IL-6 мононуклеарными клетками, но и обладает способностью стимулировать его продукцию. Этот эффект IL-4 δ 2 может быть опосредован IL-4R II типа.

Литература

1. Птицын Л.П., Смирнов С.В., Альтман И.Б. и др. Продукция рекомбинантного hIL-4 δ 2 клетками *Escherichia coli* // Биоорганическая химия. 1999. Т. 25. С. 623—629.
2. Степанов Н.Ф., Пуньшев В.И. Квантовая механика молекул и квантовая химия. М.: Изд-во МГУ, 1991. 384 с.
3. Alms W.J., Atamas S.P., Yurovsky V.V. et al. Generation of a variant of human interleukin-4 by alternative splicing // Mol. Immunol. 1996. V. 33. P. 361—370.
4. Arinobu Y., Atamas S.P., Otsuka T. et al. Antagonistic effects of an alternative splice variant of human IL-4, IL-4 δ 2, on IL-4 activities in human monocytes and B cells // Cell. Immunol. 1999. V. 191. P. 161—167.
5. Atamas S.P. Alternative splice variants of cytokines: making a list // Life Sci. 1997. V. 61. P. 1105—1112.
6. Atamas S.P., Choi J., Yurovsky V.V. et al. An alternative splice variant of human IL-4, IL-4 δ 2, inhibits IL-4-stimulated T cell proliferation // J. Immunol. 1996. V. 156. P. 435—441.
7. Atamas S.P., White B. Interleukin 4 in systemic sclerosis: not just an increase // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1999. V. 6. P. 658—659.

8. Barrera P., Faure S., Prud'homme J.F. et al. European genetic study on rheumatoid arthritis: is there a linkage of the interleukin-1 (IL-1), IL-10 or IL-4 genes to RA? // Clin. Exp. Rheumatol. 2001. V. 19. P. 709—714.
9. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z. et al. The Protein Data Bank // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. № 1. P. 235—242.
10. Callard R.E., Matthews D.J., Hibbert L. IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same? // Immunol. Today. 1996. V. 17. P. 108—110.
11. Chomarat P., Banchereau J. An update on interleukin-4 and its receptor // Eur. Cytokine Netw. 1997. V. 8. P. 333—344.
12. Isakson P.C., Pure E., Vitetta E.S. et al. T cell-derived B cell differentiation factor(s). Effect on the isotype switch of murine B cells // J. Exp. Med. 1982. V. 155. P. 734—748.
13. Klein S.C., Golverdingen J.G., Bouwens A.G. et al. An alternatively spliced interleukin 4 form in lymphoid cells // Immunogenetics. 1995. V. 41. P. 57.
14. Klein S.C., Golverdingen J.G., van Wichen D.F. et al. Expression of two interleukin 4 mRNA isoforms in B lymphoid cells // Cell. Immunol. 1996. V. 167. P. 259—268.
15. Morris G.M., Huey R., Olson A.J. Using AutoDock for ligand-receptor docking // Curr Protoc Bioinformatics. 2008. V. 11, № 3. P. 34—37.
16. Russell S.M., Keegan A.D., Harada N. et al. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor // Science. 1993. V. 262. P. 1880—1883.
17. Seah G.T., Gao P.S., Hopkin J.M. et al. Interleukin-4 and its alternatively spliced variant (IL-4 delta 2) in patients with atopic asthma // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001. V. 164. P. 1016—1018.
18. Seah G.T., Rook G.A. High levels of mRNA encoding IL-4 in unstimulated peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients revealed by quantitative nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction; correlations with serum IgE levels // Scand. J. Infect. Dis. 2001. V. 33. P. 106—109.
19. Sennikov S.V., Krysov S.V., Injelevskaya T.V. et al. Quantitative analysis of human immunoregulatory cytokines by electrochemiluminescence method // J. Immunol. Methods. 2003. V. 275. P. 81—88.
20. Zav'yalov V.P., Denesyuk A.I., White B. et al. Molecular model of an alternative splice variant of human IL-4, IL-4 delta 2, a naturally occurring inhibitor of IL-4-stimulated T cell proliferation // Immunol. Lett. 1997. V. 58. P. 149—152.

Поступила в редакцию 18.09.2009 г.

Утверждена к печати 17.03.2010 г.

Сведения об авторах

Горемыкин К.В. — аспирант кафедры биохимии и молекулярной биологии СибГМУ (г. Томск).

Силков А.Н. — канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии НИИ клинической иммунологии СО РАН (г. Новосибирск).

Шилов Б.В. — канд. мед. наук, доцент кафедры биологии и генетики СибГМУ (г. Томск).

Серебров В.Ю. — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой биохимии и молекулярной биологии СибГМУ (г. Томск).

Сазонов А.Э. — д-р мед. наук, зам. зав. ЦНИЛ СибГМУ (г. Томск).

Сенников С.В. — д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией молекулярной иммунологии НИИ клинической иммунологии СО РАН (г. Новосибирск).

Для корреспонденции

Горемыкин Константин Викторович, тел. 8-923-418-1510, e-mail: covigo@mail.ru.