

ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА ТРОМБОСПОНДИНА-1, КОМПОНЕНТА ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА И ИНГИБИТОРА АНГИОГЕНЕЗА

Кузнецова С.А., Крылов А.В., Киселева Е.П.

Отдел иммунологии, ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

Резюме. Тромбоспондин-1 (TSP-1) является белком внеклеточного матрикса и способен регулировать адгезию, миграцию, пролиферацию и выживаемость различных типов клеток, включая клетки иммунной системы. Многие клетки организма секретируют TSP-1, и его экспрессия значительно выражена в местах тканевого повреждения и восстановления (репарации). Первоначально TSP-1 был охарактеризован как эндогенный ингибитор ангиогенеза. Известно, что этот фактор обладает антиангиогенными свойствами, которые заключаются в ингибировании пролиферации эндотелиальных клеток *in vitro* и роста сосудов *in vivo*. Получены многочисленные свидетельства участия TSP-1 в процессах клеточной регуляции при эмбриональном развитии, поддержании нормального гомеостаза тканей во взрослом организме, в процессе ранозаживления, иммунного ответа, а также при опухолевом росте. TSP-1 представляет собой большую тримерную молекулу матриклеточного гликопротеина, состоящую из множества структурных доменов, взаимодействующих с разнообразными рецепторами и молекулами. Многие клетки крови и их предшественники обладают способностью как продуцировать TSP-1, так и взаимодействовать с ним. В настоящем обзоре даны современные представления об участии TSP-1 в процессах дифференцировки, созревания и функционирования клеток иммунной системы.

Ключевые слова: тромбоспондин, внеклеточный матрикс, ангиогенез, воспаление.

Kuznetsova S.A., Krylov A.V., Kiseleva E.P.

IMMUNOREGULATORY PROPERTIES OF THROMBOSPONDIN-1, A EXTRACELLULAR MATRIX COMPONENT AND ANGIOGENESIS INHIBITOR

Abstract. Thrombospondin-1 (TSP-1) is an extracellular matrix glycoprotein that can positively or negatively regulate adhesion, motility, proliferation, and survival of various cell types, including cells of the immune system. It is secreted by numerous cell types, and its expression is predominant in areas of tissue injury or remodeling. Initially, TSP-1 was identified as one of the first endogenous inhibitors of angiogenesis. This factor is known to be a potent inhibitor of angiogenesis, as demonstrated by *in vitro* inhibition of endothelial cell proliferation and *in vivo* vascular growth. Since then, much has been learned about its ability to modulate cell behavior during embryonic development, to maintain normal homeostasis of adult organism, wound healing, immune response, tumor growth. TSP-1 is a large, trimeric, matricellular protein, composed of multiple structural domains that interact with a diverse array of receptors and molecules. Many hematopoietic and immune cells are able of both producing TSP-1 and responding to it. This review presents a current understanding on participation of TSP-1 in differentiation, maturation and functioning of immune cells. (*Med. Immunol.*, vol. 10, N 6, pp 499-506)

Адрес для переписки:

Кузнецова Светлана Анатольевна
197376, Санкт-Петербург, ул. Ак. Павлова, 12.
Тел.: (812) 234-16-69.
Факс: (812) 234-94-89.
E-mail: Kuznetsova4872@yahoo.co.uk

Введение

В процессе дифференцировки, созревания и активации иммунокомпетентные клетки неизбежно контактируют с рецепторами на поверхности эндотелия и компонентами внеклеточного матрикса, что вносит свой вклад в реализацию защитных функций. Основными структурными компонентами

внеклеточного матрикса являются коллагены, протеогликаны, гиалуроновая кислота, эластин, фибронектин и некоторые ламинины. Тромбоспондин-1 (TSP-1) является минорным, так называемым «матрикеточным» компонентом матрикса, который присутствует временно и появляется на определенных этапах развития или при патологических состояниях [9, 27]. TSP-1 является большим гликопротеином, состоящим из множества структурных доменов, которые взаимодействуют с широким спектром рецепторов на поверхности клеток или другими лигандами, что в свою очередь определяет многофункциональность этой молекулы [2].

Исторически TSP-1 был охарактеризован и изучен прежде всего как эндогенный ингибитор ангиогенеза. Ангиогенез — это сложный и многоэтапный процесс формирования сосудов из существующей капиллярной сети путем прогрессивной инвазии и прорастания эндотелиальных клеток. Убедительно показано, что TSP-1 ингибирует адгезию, пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток *in vitro*, а также ангиогенез *in vivo* [38, 43, 24, 25].

В настоящее время известно девять рецепторов TSP-1 на поверхности эндотелиальных клеток, среди них: $\alpha 3\beta 1$ -, $\alpha 4\beta 1$ -, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$ - и $\alpha v\beta 3$ -интегрины, белок, связанный с ЛПНП-подобным рецептором (LRP) ассоциированный с кальретикулином, гепарансульфат протеогликан, CD36 и CD47. Экспрессия и активность некоторых рецепторов TSP-1 регулируется частично на клеточном уровне, а частично — конформационными изменениями молекулы в результате взаимодействия с другими компонентами внеклеточного матрикса.

Перечисленные рецепторы не являются специфическими маркерами эндотелиальных клеток, экспрессируются клетками разных типов, и большинство из них представлено на поверхности клеток иммунной системы. Взаимодействия между этими клетками и TSP-1 во взрослом организме происходят в местах регенерации тканей при повреждении, ранозаживлении, где отмечается интенсивная экспрессия TSP-1 и развитие воспалительной реакции. Нормальная плазма крови человека содержит низкие, но значимые уровни растворимой формы TSP-1, которая является физиологическим регулятором передачи сигнала от оксида азота (NO) [25]. Кроме того, увеличенные уровни экспрессии TSP-1 в тканях являются характеристикой некоторых хронических заболеваний, таких как ревматоидный артрит, атеросклероз, диабет и другие. В настоящем обзоре приводится обобщение современных литературных данных, указывающих на важные иммунорегуляторные функции TSP-1, которые до недавнего времени оставались практически не изученными.

Строение молекулы, лиганды, рецепторы

TSP-1 является гомотримером с молекулярной массой примерно 450 kDa (рис. 1). Каждый мономер включает в себя глобулярный NH_2 -терминальный гепарин, связывающий домен, линейный участок молекулы, состоящий из проколлагенового домена и участка олигомеризации, так называемые три повтора первого типа (известные также как пропердин-домены), три повтора второго типа (EGF-подобные домены), семь повторов третьего типа (Ca-связывающие домены) и глобулярный COOH -терминальный домен. Три мономера соединены ковалентно дисульфидными связями в области олигомеризации, расположенной близко к NH_2 -терминальному домену [2, 19].

NH_2 -терминальный домен является основным высокоаффинным гепарин-связывающим участком TSP-1. Кроме того, этот домен содержит участки связывания с широким спектром макромолекул, включая гепарансульфат протеогликан, как на поверхности клеток, так и в составе внеклеточного матрикса, интегрины, ЛПНП-рецепторподобный белок (LRP), кальретикулин, сульфогликолипиды [17].

Повторы первого типа включают участки связывания латентной формы TGF β , гликозаминогликаны, фибронектин и CD36 [19, 25]. Следует отметить, что CD36, помимо тромбоспондина, является рецептором для большого количества лигандов, включая клетки, подвергшиеся апоптозу, модифицированные формы липопротеинов низкой плотности, компоненты клеточных стенок грам-положительных бактерий, фибриллярный бета-амилоид и другие. Этот факт в комплексе с широко распространенной экспрессией CD36 на поверхности макрофагов, дендритных и эндотелиальных клеток и в тканях указывает на важную роль многофункционального рецептора, как при физиологических, так и патологических условиях [18].

Мало что известно о специфических лиганд-связывающих активностях EGF-подобного домена или повторов второго типа.

Среди повторов третьего типа находятся участки связывания ионов кальция, что влияет на структуру и функциональную активность молекулы, интегрин-связывающий мотив, участки связывания компонентов внеклеточного матрикса и протеаз. Особенное значение имеет участок связывания CD47 на поверхности клеток, который расположен в наиболее консервативной COOH -терминальной части молекулы TSP-1 [1]. CD47 экспрессируется практически всеми типами клеток и помимо TSP-1 взаимодействует

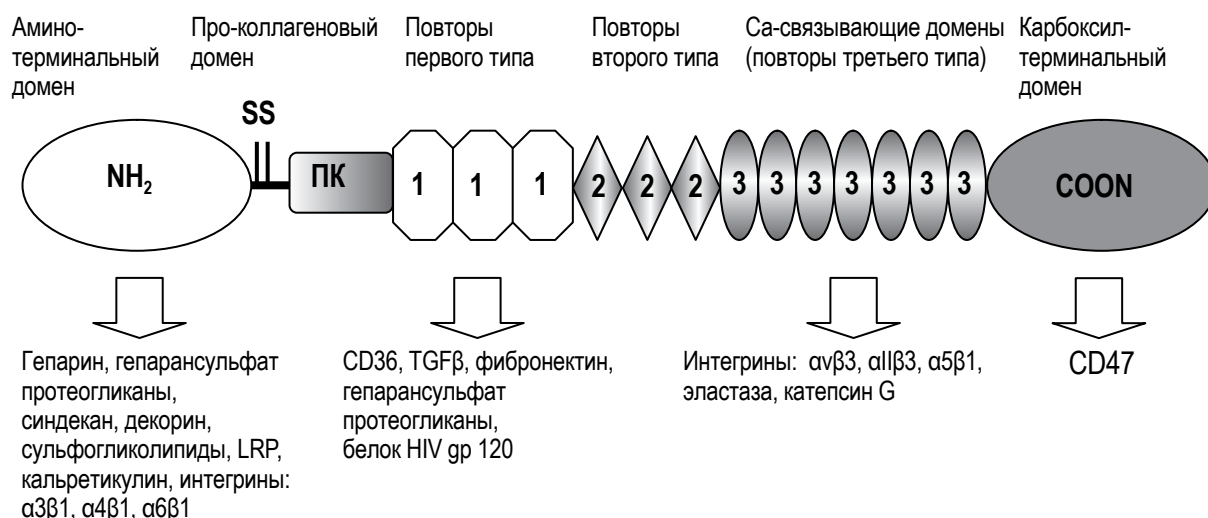


Рисунок 1. Схематическое изображение структурных и функциональных доменов субъединицы молекулы тромбоспондина-1 (TSP-1)

Примечания. TSP-1 является гомотримером, каждая субъединица которого включает в себя сигнальный пептид (аминокислоты 1-18), аминокислотный домен (аминокислоты 19-251), участок олигомеризации (аминокислоты 252-256), про-коллагеноподобный домен (аминокислоты 275-373), три повтора первого типа (аминокислоты 379-547), три повтора второго типа (аминокислоты 549-690), семь повторов третьего типа (аминокислоты 723-950) и глобулярный карбоксил-терминальный домен (аминокислоты 951-1170). В нижней части рисунка приведены те рецепторы и лиганды TSP-1, к которым хорошо охарактеризованы сайты связывания на поверхности белка.

с белками, регулирующими проведение сигнала (Signal regulatory proteins (SIRP)), играя, как было показано, важную роль в процессах поддержания гомеостаза и иммунорегуляции [12].

Таким образом, сложная структура молекулы TSP-1 и наличие нескольких различных участков связывания как рецепторов на поверхности клеток, так и компонентов внеклеточного матрикса, позволяют предположить возможность одновременного взаимодействия с различными рецепторами на поверхности одной клетки, разных клеток или одновременного взаимодействия с рецептором и с внеклеточным протеином.

Продукция, синтез TSP-1

TSP-1 секретируется различными клетками, и его экспрессия ассоциирована, главным образом, с местами активного восстановления поврежденных тканей или с рядом патологических состояний. Было показано, что многие клетки синтезируют TSP-1 при культивировании *in vitro*. При этом наиболее выраженный уровень синтеза наблюдается при полуконфлюентных условиях культивирования и активно пролиферирующими клетками. Увеличенные уровни экспрессии мРНК были обнаружены в ответ на факторы роста (PDGF, bFGF, TGFβ1) и условия гипоксии и, наоборот, снижение экспрессии TSP-1 в ответ на IL-1β и TNFα [2]. Было показано, что IL-6 дозозависимо индуцирует экспрессию и синтез TSP-1 эндотелиальными клетками аорты свиньи, IFNγ очень незначительно влияет на экспрес-

сию, в то время как ФМА ингибирует экспрессию TSP-1 [26]. Длительная экспозиция эндотелиальных клеток *in vitro* в присутствии низких концентраций различных противоопухолевых препаратов вызывает значительное усиление экспрессии гена и белка TSP-1 [8].

Моноциты периферической крови человека демонстрируют быстрое и значительное увеличение уровней мРНК TSP-1 после обработки М-CSF, дексаметазоном и IFNγ. ФМА, напротив, ингибирует уровни экспрессии TSP-1 [46]. Синтез мРНК TSP-1 был индуцирован М-CSF в культурах макрофагов человека после короткой инкубации (3 часа) с последующим обнаружением белкового продукта, ассоциированного с клеточной мембраной в комплексе с неизвестным белком. GM-CSF индуцировал мРНК TSP-1 на более поздних промежутках времени. Этот эффект, как было показано, опосредован эндогенным синтезом М-CSF [15].

Незрелые дендритные клетки человека моноцитарного происхождения спонтанно продуцируют TSP-1, уровни продукции которого значительно увеличиваются после обработки клеток PGE₂ и в меньшей степени – TGFβ. В ходе своего созревания дендритные клетки продолжают синтезировать этот белок, причем уровни продукции дополнительно увеличиваются под воздействием микробных стимулов и цитокинов (IL-10 и TGFβ) [16]. Усиление синтеза и продукции TSP-1 дендритными клетками человека моноцитарного происхождения было индуцировано с помощью АТФ. Внеклеточные нуклеотиды