

Адгезивные белки в процессе воспаления

Д. Д. Жерносеков

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины
Ул. Леонтовича, 9, Киев, 01601, Україна

chemikdd@mail.ru

При воспалении различные адгезивные молекулы экспрессируются клетками эндотелия и крови. В формировании воспалительного ответа на определенных стадиях процесса включаются белки адгезии иммуноглобулинового, селектинового и интегринового семейств. В работе охарактеризованы участвующие в воспалительном процессе адгезивные белки и их лиганды, а также намечены основные пути поиска противовоспалительных антиадгезивных препаратов на основе структурных особенностей адгезивных молекул.

Ключевые слова: селектины, интегрин, Ig-CAM, воспаление.

Классическая схема развития воспалительной реакции организма, при которой происходят связывание лейкоцитов с эндотелием и последующая миграция этих кровяных клеток к месту воспаления, описана более 150 лет назад. Однако понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе таких процессов, стало возможным относительно недавно, когда были изучены белки клеточной адгезии (CAM-cell adhesion molecules), на молекулярном уровне обеспечивающие взаимодействие клеток крови с эндотелием. Различают четыре этапа воспалительного ответа, причем каждый из них характеризуется экспрессией определенных адгезивных молекул [1]. Первый этап называют роллингом, в это время замедляется движение лейкоцитов (моноцитов, нейтрофилов и лимфоцитов) вдоль сосудистой стенки. Этот процесс обусловлен селектинами – белками адгезии, способными связываться с углеводным лигандом на поверхности клеток

[2]. Примечательно, что селектиновые белки экспрессируются и эндотелием, и лейкоцитами. Роллинг не обеспечивает прочной адгезии лейкоцитов к эндотелию, но приводит к их активации и последующей активации интегринов. Интегрины – следующий класс адгезивных молекул, с их участием осуществляется второй этап воспалительного процесса – активация лейкоцитов и тромбоцитов и переход этих клеток в состояние повышенной адгезивности, сопровождающееся изменением формы клеток.

Третий этап характеризуется прочным прикреплением лейкоцитов к эндотелию. На молекулярном уровне это происходит за счет взаимодействия интегринов с белками адгезии иммуноглобулинового семейства, Ig-CAM.

На четвертом этапе лейкоциты должны пройти через клетки эндотелия к месту воспаления (диapedез). Считается, что в этом процессе главную роль играют белки Ig-семейства. Накопленные в литературе данные позволяют воспроизвести поэтапное

включение адгезивных белков в воспалительный процесс.

Роллинг. В отсутствие воспалительной реакции процесс роллинга не наблюдается. Сигналом для его начала служит действие провоспалительных агентов, переводящих эндотелий сосудов в активированное состояние. Такими агентами являются гистамин, тромбин, брадикинин, лейкотриен С₄ или свободные радикалы. С изучением процесса роллинга круг провоспалительных агентов расширился, что довольно четко отражено в работе [3]. Активация эндотелия приводит к экспрессии двух важных представителей семейства селектинов: Е-селектина (Е – endothelial – эндотелиальный) и Р-селектина (Р – platelet – тромбоцитарный). В научной литературе эти белки классифицированы по кластерам дифференцировки (CD62-Е и CD62-Р соответственно). Несмотря на свое название, Р-селектин – важнейший показатель воспалительного состояния эндотелия.

С другой стороны, в ответ на действие воспалительных агентов наблюдается повышенная экспрессия L-селектина (L – leukocyte – лейкоцитарный), другое его название CD62-L. Селективные белки для связывания имеют специфические лиганды. Эти лиганды достаточно хорошо изучены: для Р-селектина – гликопротеиновый лиганд (PSGL) и тетрасахарид Льюиса (CD15S), состоящий из остатков галактозы, N-ацетилглюкозамина, фукозы и сиаловой кислоты; для L-селектина – муциноподобные белки эндотелия: мукозальный адрессин MAdCAM, GlyCAM-1 и CD34; для Е-селектина – лейкоцитарный гликопротеин, содержащий остаток фукозы и сиаловой кислоты [3].

Следует отметить, что PSGL может связывать все селектины и для всех селективных белков важно наличие в молекуле лиганда остатка сиаловой кислоты.

Таким образом, экспрессия селектинов клетками эндотелия и лейкоцитами обеспечивает замедление движения клеток крови вдоль сосуда [4]. Кроме того, по мнению ряда авторов, наиболее важным моментом в роллинге является экспрессия на эндотелии Р-селектина, который высвобождается из телец Вэйбеля-Пэлэйда эндотелиальных клеток и способен связываться с PSGL на поверхности мо-

ноцитов, нейтрофилов и тромбоцитов [5, 6]. Трансмембранная изоформа Р-селектина вследствие протеолитической деградации образует растворимую изоформу этого белка, sP-селектин (s – soluble – растворимый). Этот белок, связавшись с моноцитами, способствует появлению на их поверхности тканевого фактора – индуктора свертывания крови [5]. Приведенный факт отражает тесную взаимосвязь процессов воспаления и тромбообразования.

Следует отметить, что селективная адгезия непрочна и обратима, однако в условиях действия стимулирующих агентов селектиновый роллинг активирует лейкоциты. Детальный механизм этого процесса не выяснен, но можно предположить следующую последовательность лейкоцитарной активации. Связывание L-селектина с лигандом на эндотелии вызывает внутриклеточное высвобождение ионов кальция. Эти ионы оказывают активирующее действие на лейкоцитарные интегрины и стимулируют синтез матричных РНК, необходимых для синтеза цитокинов [7]. В свою очередь цитокины активируют клетки эндотелия и невовлеченные в роллинг лейкоциты. Примечательно, что лейкоцитарные селектины в процессе связывания с лигандом на поверхности эндотелия образуют кластеры в местах клеточного контакта [8]. После активации интегринов селективные кластеры являлись совместно с интегриновыми.

Логично предположить, что кластеризация селектинов является условием для последующей активации интегриновых адгезивных белков. В работе Симона и Грина высказано предположение о механотрансдукторной роли селектинов, т. е. об их участии в процессе передачи сигнала внутрь клетки [1]. Связывание L-селектина с лигандом обеспечивает фосфорилирование тирозинового остатка цитоплазматического домена селективного белка, что способствует активации ряда внутриклеточных киназ и, в конечном итоге, – переходу интегринов в высокоаффинное состояние и прочной клеточной адгезии [9].

Лейкоцитарная активация и переход интегринов в высокоаффинное состояние. Как указано выше, роллинг и кластеризация селектинов активируют лейкоциты. При этом меняется их форма и лейко-

цитарные интегрин, находящиеся на поверхности клеток, переходят из состояния низкой аффинности в высокоаффинное состояние, при котором происходит их эффективное связывание с лигандами на соседних лейкоцитах и эндотелии. Интегрины – это трансмембранные гликопротеины, состоящие из нековалентно связанных α - и β -субъединиц. Наиболее важными интегрин, участвующими в воспалительном ответе, являются α_2 -интегрины: LFA-1 (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11b/CD18) [10, 11]. Исследование поверхности покоящегося нейтрофила показало, что на одной такой клетке может существовать около 15000 сайтов связывания, обеспечиваемых интегрин Mac-1, и 50000 сайтов, обеспечиваемых LFA-1. Из них в состоянии высокой аффинности находятся 1000 сайтов интегрин Mac-1 и 9000 сайтов LFA-1 [12].

Активация нейтрофила сопровождается возрастанием экспрессии Mac-1, при этом количество сайтов связывания достигает 140000, однако из них только 13000 сайтов находятся в высокоаффинном состоянии.

Экспрессия LFA-1 имеет свои особенности. В период активации нейтрофила в течение нескольких секунд около 100 % всего количества экспрессируемого LFA-1 переходит в активное состояние. В то же время связывание LFA-1 с лигандом не является прочным и в течение 30 с после активации нейтрофила может быть полностью ликвидировано. Mac-1 в отличие от LFA-1 способен находиться в активной конформации и поддерживать связывание с лигандом в течение 10 мин с момента активации. Можно сделать вывод о различной функциональной роли этих двух интегрин. По-видимому, LFA-1 служит для быстрого включения в процесс роллинга и обратимого контакта активированного лейкоцита, тогда как Mac-1 обеспечивает длительный прочный адгезивный контакт.

Интегриновые белки способствуют также установлению контакта между лейкоцитами и тромбоцитами [5, 6]. Здесь основная роль принадлежит Mac-1, поскольку этот интегрин может связывать разнообразные лиганды. На рисунке показано, что контакт Mac-1 может быть либо опосредован другими адгезивными молекулами, например, фибриногеном и витронектином, либо установлен благо-

даря взаимодействию этого интегрин с тромбоцитарным адгезивным белком GPIIb (GPIIb – гликопротеин).

В свою очередь, на поверхности покоящегося тромбоцита наблюдается постоянная экспрессия α_3 -интегрин GPIIb/IIIa. Селективный роллинг может переводить тромбоцит в активированное состояние и GPIIb/IIIa обеспечит взаимодействие тромбоцитов с лейкоцитами посредством связывания фибриногена. Не случайно антикоагулянтные препараты, блокирующие адгезивное действие GPIIb/IIIa, обладают и противовоспалительным действием [13, 14].

Взаимодействие интегрин с адгезивными белками эндотелия. Основным лигандом для связывания α_2 -интегрин с эндотелием являются белки адгезии иммуноглобулинового семейства. Некоторые из них, в частности I-CAM-2, постоянно экспрессируются клетками эндотелия, другие же (I-CAM-1 и I-CAM-3) экспрессируются только в условиях активации эндотелия [15]. I-CAM-1 является наиболее специфичным лигандом для интегрин LFA-1, другие лиганды (I-CAM-2 и I-CAM-3) имеют гораздо меньшее сродство к этому интегрину [16]. Кроме I-CAM белков, для клеток активированного эндотелия характерна экспрессия еще одного представителя Ig-семейства – белка V-CAM-1. Этот белок имеет несколько молекулярных изоформ благодаря альтернативному сплайсингу. Преобладающая изоформа V-CAM-1 включает семь Ig-подобных доменов. Первый и четвертый домены обеспечивают связывание V-CAM-1 с интегрин VLA-4 на поверхности моноцита. Связывание с эндотелиальными адгезивными белками приводит к перераспределению интегрин на клеточной поверхности. Показано, что после установления прочных адгезивных контактов вытянувшиеся участки нейтрофила втягиваются в клетку и в месте контакта наблюдается кластеризация LFA-1 и Mac-1 [17, 18]. По-видимому, это является сигналом для следующего этапа.

Диapedез. Пожалуй, это наименее изученный этап в воспалительной реакции. Считают, что главный адгезивный белок, участвующий в процессе диapedеза, – молекула адгезии Ig-семейства PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion

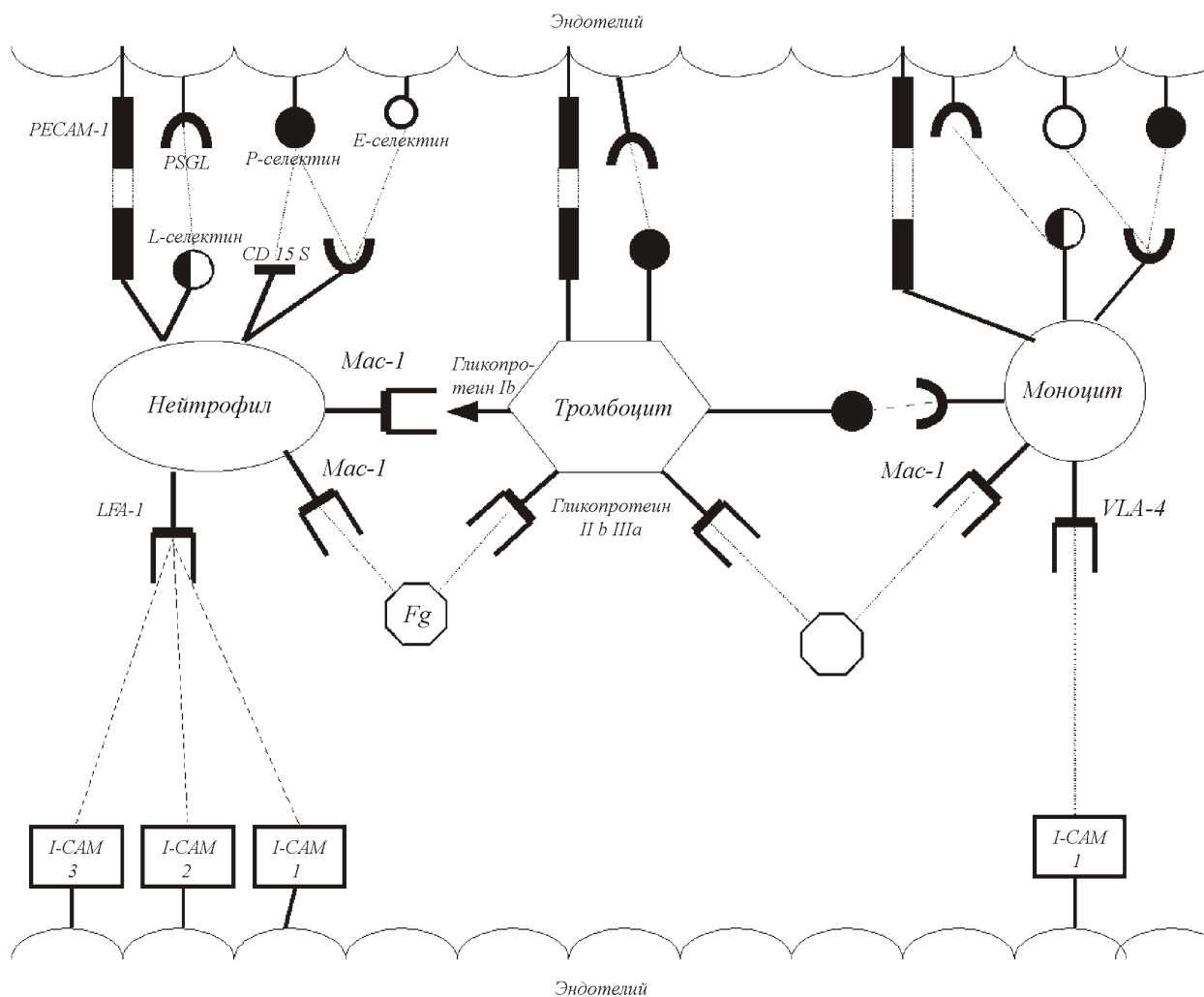


Схема взаимодействия адгезивных белков клеток крови и эндотелия

molecule). Наличие PECAM-1 на поверхности эндотелия и лейкоцитов позволяет ему осуществлять гомотильный контакт [19]. В моделях *in vitro* показано, что антитела к белку PECAM-1 в значительной степени блокировали трансмиграцию лейкоцитов через монослой активированных эндотелиальных клеток, при этом на адгезию нейтрофилов к клеткам эндотелия эти антитела не влияли [3]. Каким образом происходит процесс трансмиграции, остается невыясненным, но можно предположить, что в ответ на хемотактический стимул сигнал передается с помощью белка PECAM внутрь эндотелиальной клетки, при этом повышается уровень внутриклеточного кальция и изменений в цитоске-

лете. В конечном итоге это способствует ослаблению контакта между эндотелиальными клетками.

Современные подходы к использованию антиадгезивных препаратов для блокирования воспалительного процесса. Несмотря на то, что воспалительная реакция является естественным защитным средством организма, в случае перехода этого процесса в хроническое состояние происходит деструкция здоровых тканей и ослабление иммунитета. Выяснение молекулярных механизмов воспалительной реакции позволяет разрабатывать определенные подходы, направленные в первую очередь на снижение адгезивных свойств эндотелия и/или лейкоцитов [21, 22]. Наиболее эффектив-

ным средством представляется использование моноклональных антител к адгезивным белкам. Однако до настоящего времени не было сообщений о применении гуманизированных антител к селективным белкам в терапевтических целях. Имеющиеся данные о свойствах упомянутых антител к интегриновым белкам носят исследовательский характер [23].

Более перспективным видится подход, связанный с использованием активных и стабильных аналогов тетрасахарида Льюиса и подобных углеводных фрагментов для блокирования селективного роллинга.

Относительно недавно в лаборатории Прейсснера [23] было изучено действие фрагментов ангиостатина в качестве противовоспалительных агентов. Ангиостатин – природный компонент, образующийся в результате протеолитической деградации плазминогена. Показано, что сам ангиостатин и его фрагменты (кринглы 1–3 либо четвертый крингл) блокировали адгезию лейкоцитарных интегринов к I-CAM-1, фибриногену и витронектину. Данный подход был бы самым приемлемым, если бы удалось найти решение прионовой проблемы: кринглы плазминогена обладают высокой специфичностью к прионовым белкам [24].

Подводя итог, можно сделать заключение о том, что изучение структурно-функциональных особенностей адгезивных белков и их лигандов, а также системы их природного протеолиза еще не завершено. Будущие исследования в этой области должны помочь в поиске эффективных противовоспалительных препаратов.

D. D. Zhernossekov

Adhesive proteins in inflammation process

Summary

The inflammation process is accompanied by the expression of different adhesive molecules on the surface of both endothelium and blood cells. The adhesion proteins of immunoglobulin, selectin, and integrin family are involved at the certain stages of inflammation response. To cure chronic inflammation processes the selective influence on the molecular mechanism of adhesive interaction of leukocytes is necessary. In the present paper the search for anti-inflammatory anti-adhesive preparations on the basis of structural features of adhesive molecules is discussed.

Keywords: selectins, integrins, Ig-CAM, inflammation.

Д. Д. Жерносков

Адгезивні білки у процесі запалення

Резюме

При запаленні різноманітні адгезивні молекули експресуються клітинами ендотелію та крові. До формування запальної відповіді на певних стадіях цього процесу причетні білки адгезії імуноглобулінової, селектинової та інтегринової родин. Охарактеризовано адгезивні білки та їхні ліганди, що беруть участь у процесі запалення, а також намічено основні шляхи пошуку протизапальних антиадгезивних препаратів на базі структурних особливостей адгезивних молекул.

Ключові слова: селектини, інтегрини, Ig-CAM, запалення.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Simon S. I., Green C. L.* Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation // *Annu. Rev. Biomed. Eng.*–2005.–N 7.–P. 151–185.
2. *Kansas G. S.* Selectins and their ligands: current concepts and controversies // *Blood.*–1996.–N 88.–P. 3259–3287.
3. *Albelda S. M., Smith C. W., Ward P. A.* Adhesion molecules and inflammatory injury // *FASEB J.*–1994.–N 8.–P. 504–512.
4. *Rodgers S. D., Camphausen R. T., Hammer D. A.* Sialyl Lewis (x)-mediated, PSGL-1-independent rolling adhesion on P-selection // *Biophys. J.*–2000.–79.–P. 694–706.
5. *Струкова С. М.* Роль тромбоцитов и сериновых протеиназ в сопряжении свертывания крови и воспаления // *Биохимия.*–2004.–69, № 10.–С. 1314–1331.
6. *Волков Г. Л., Платонова Т. Н., Савчук А. Н., Горницкая О. В., Чернышенко Т. М., Краснобрижая Е. Н.* Современные представления о системе гемостаза.–К.: Наук. думка, 2005.–296 с.
7. *Brenner B., Kadel S., Birlle A., Linderkamp O.* L-selectin tyrosine phosphorylates cb1 and induces association of tyrosine phosphorylated cb1 with crk1 and grb2 // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*–2001.–282.–P. 41–47.
8. *Green C. E., Pearson D. N., Christensen N. B., Simon S. I.* Topographic requirements and dynamics of signaling via L-selectin on neutrophils // *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.*–2003.–284.–P. 705–717.
9. *Waddel T. K., Kialkow L., Chan C. K., Kishimoto T. K., Downey G. P.* Signaling functions of L-selectin. Enhancement of tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase // *J. Biol. Chem.*–1995.–270.–P. 15403–15411.
10. *Schmid-Schonbein G. W.* Analysis of inflammation // *Annu. Rev. Biomed. Eng.*–2006.–8.–P. 93–151.
11. *Hilden T. J., Nurmi S. M., Fagerholen S. G., Gahmberg C. G.* Interfering with leukocyte integrin activation a novel concept in the development of anti-inflammatory drugs // *Ann. Med.*–2006.–38.–P. 503–511.
12. *Lum A. F., Green C. E., Lee G. R., Staunton D. E., Simon S. I.* Dynamic regulation of LFA-1 activation and neutrophil arrest on I-CAM-1 in shear flow // *J. Biol. Chem.*–2002.–277.–P. 20660–20670.
13. *Mousa S. A.* Methods in molecular medicine. Anticoagulants, antiplatelets and thrombolytics.–New York: Humana press, 2004.–320 p.
14. *Meyer A., Auernheimer I., Modlinger A., Kesler H.* Targeting RGD recognizing integrins: drug development, biomaterial

- research, tumor imaging and targeting // *Curr. Pharm. Design.*—2006.—**12**.—P. 2723–2747.
15. *Chen C. C.* Signal transduction pathways of inflammatory genes expression and therapeutic implications // *Curr. Pharm. Design.*—2006.—**12**.—P. 3497–3508.
16. *de Fougerolles A. R., Qin X., Springer T. A.* Characterization of the function of intercellular adhesion molecule (I-CAM)-3 and comparison with I-CAM-1 and I-CAM-2 in immune responses // *J. Exp. Med.*—1994.—**179**.—P. 619–629.
17. *Kim S., Carman C. V., Yang W., Salas A., Springer T. A.* The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin α Lb2 // *J. Cell. Biol.*—2004.—**167**.—P. 1241–1253.
18. *Shav S. K., Ma S., Kim M. B., Rao R. M., Hartman C. U., Froio R. M., Yang L., Jones T., Liu Y., Nusrat A., Parcos C. A., Luscinskas F. W.* Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial I-CAM-1 accompany neutrophil transmigration // *J. Exp. Med.*—2004.—**200**.—P. 1571–1580.
19. *Newman P. J., Newman D. K.* Signal transduction pathways mediated by PECAM-1. New roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*—2003.—**23**.—P. 953–964.
20. *Simmons D. L.* What makes a good anti-inflammatory drug target? // *Drug Discov. Today.*—2006.—**11**.—P. 210–219.
21. *Humby F., Manzo A., Pitzalis C.* Chemokines in arthritis: key molecules in pathogenesis and potential therapeutic targets // *Fut. Rheum.*—2006.—**1**.—P. 53–66.
22. *Sims M. J., Hassal D. G., Brett S., Rowan W.* A humanized CD 18 antibody can block function without cell destruction // *J. Immunol.*—1993.—**151**.—P. 2296–2308.
23. *Chavakis T., Athanasopoulos., Rhee J.-S., Orlova V., Schmidt-Woll T., Bierhaus A., May A., Celik I., Nawroth P. P., Preissner K. T.* Angiostatin is a novel anti-inflammatory factor by inhibiting leukocyte recruitment // *Blood.*—2005.—**105**.—P. 1036–1043.
24. *Fischer M. B., Roeckl C., Partzek P., Schwarz H. P., Aguzzi A.* Binding of disease-associated prion protein to plasminogen // *Nature.*—2000.—**408**, N 11.—P. 479–483.

УДК 577.112

Надійшла до редакції 03.06.07