

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.115.12

©Коллектив авторов

ПЕПТИД-АГОНИСТ РЕЦЕПТОРА, АКТИВИРУЕМОГО ПРОТЕАЗАМИ, СТИМУЛИРУЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЕРАТИНОЦИТОВ И ЗАЖИВЛЕНИЕ РАНЫ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО ПЛАСТА ПОДОБНО АКТИВИРОВАННОМУ ПРОТЕИНУ С

Е.В. Киселева^{1}, М.В. Сидорова², Л.Р. Горбачева^{3,4}, С.М. Струкова³*

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
119331, Москва, ул. Вавилова, д. 26; тел.: (499) 135-40-81, 910-417-96-77;
факс: (499) 135-80-12; эл. почта: evkiseleva@mail.ru

²Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, Москва

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва

Активированный протеин С (АПС) – сериновая протеаза гемостаза, независимо от антикоагулянтной активности проявляет противовоспалительные и антиапоптотические свойства, которые обуславливают возможность протекторного действия АПС при разных заболеваниях, включая сепсис и заживление хронических ран. Предположив, что цитопротекторное действие АПС на клетки, участвующие в заживлении ран, может быть, по-видимому, имитировано пептидами – аналогами “привязанных лигандов”, которые активируют протеазами активируемый рецептор 1 типа (ПАР1), мы синтезировали пептид (АП9) – аналог привязанного лиганда пептида агониста ПАР1, освобождаемого АПС. В работе впервые показано, что пептид АП9 (0,1- 10 мкМ), подобно протеазе АПС (0,01-100 нМ), стимулирует пролиферативную активность первичных кератиноцитов человека. В модели раны эпителиального пласта пептид АП9, также как протеаза АПС, ускоряет закрытие раны. С помощью специфических антител был изучен рецепторный механизм действия АП9 при заживлении раны в сравнении с действием АПС. Показана необходимость рецептора ПАР1 и эндотелиального рецептора протеина С (ЭПСР) для пролиферативной активности агонистов. Выявленная в нашей работе имитация пептидом 9 - лигандом ПАР1, действия АПС на кератиноциты указывает на возможность использования пептида АП9 для стимуляции репарации тканей.

Ключевые слова: пептид-агонист рецептора, активируемого протеазами, протеин С, заживление раны, кератиноциты.

ВВЕДЕНИЕ

Ключевые протеазы гемостаза, тромбин и активированный протеин С (АПС), контролируют процессы воспаления, репарации тканей, заживления ран, взаимодействуя с рецепторами, активируемыми протеазами (ПАР), преимущественно типа 1 – ПАР1 [1-5]. ПАР принадлежат к суперсемейству семидоменных трансмембранных рецепторов, связанных с G-белками. Отличительная особенность активации ПАР – ограниченный протеолиз внеклеточного фрагмента рецептора с образованием “привязанного лиганда”,

который активирует рецептор и запускает внутриклеточную сигнализацию [6, 7].

До последнего времени оставалось не ясным, как зависящая от ПАР1 регуляция клеточных функций прокоагулянтом – тромбином, или антикоагулянтом – АПС, приводит к диаметрально противоположным эффектам – провоспалительному действию тромбина, реализуемому через G-белки, и цитопротекторному действию АПС, через β-аррестин 2, независимо от G-белков [8, 9]. Недавно обнаружено, что в отличие от тромбина, который канонически расщепляет ПАР1 по Arg41,

* - адресат для переписки

НОВЫЙ ПЕПТИД-АГОНИСТ PAR1 СТИМУЛИРУЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЕРАТИНОЦИТОВ

АПС, связывая вначале эндотелиальный рецептор протеина С (ЭПСР), расщепляет PAR1 по Arg46 [10]. Новый неканонический лиганд (Tr-47 пептид) PAR1 стимулирует, подобно АПС, цитопротекторный путь сигнализации в культивируемых клетках эндотелия и стабилизирует эндотелиальный барьер [10]. Напротив, тромбин и канонический привязанный лиганд PAR1 оказывают провоспалительное действие и повышают проницаемость эндотелия [10]. Мы развиваем гипотезу, что действие АПС на клетки, участвующие в заживлении ран, также может быть имитировано пептидами – аналогами “привязанных лигандов”.

Целью настоящей работы было исследование влияния синтетического неканонического пептида – агониста PAR1 (АП9) на пролиферативную активность кератиноцитов, на процесс заживления раны в модели раны эпителиального пласта *in vitro* и анализ рецепторного механизма ранозаживляющего действия АП9 в сравнении с действием протеазы АПС.

МЕТОДИКА

Неканонический пептид PAR1, освобождаемый АПС, пептид 9 (NPNDKYERF амид, АП9) синтезирован в Российском кардиологическом научно-производственном комплексе Fmoc-(9-флуоренил-метоксикарбонил) твердофазным методом. Структура пептида подтверждена данными ¹H-ЯМР- спектроскопии, масс-спектрометрии, а его гомогенность – данными аналитической ВЭЖХ. В работе использовали: АПС (“Sigma”, США), антитела производства “Santa Cruz Biotechnology” (Германия) против рецептора тромбина PAR1 – АТАР2, S19; против PAR3 – H103; против ЭПСР – P20.

Кератиноциты человека выделяли из кусочков кожи, полученных в ходе хирургических операций, по ранее описанному методу [11]. Образцы были собраны в соответствии с правилами, утверждёнными экспертной комиссией по биоэтике Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Согласие на использование операционного материала было получено от всех пациентов. Исследования проводились в соответствии с принципами Хельсинской декларации. Клетки культивировали в среде DMEM:F12 (“Gibco”, США) содержащей 10% сыворотки плода коровы (“HyClone”, США), 4 мМ L-глутамин (“Sigma”), 5 мкг/мл инсулина

(“Sigma”), 10⁻⁶ М изопротеренол (“Sigma”), 10 нг/мл EGF (“Sigma”). Для исключения влияния сыворотки и эпидермального фактора роста на пролиферацию исследования проводили в среде, не содержащей эти факторы.

Для количественной оценки клеток, экспрессирующих рецепторы PAR1 и ЭПСР, проводили двойное окрашивание суспензии первичных кератиноцитов человека 1 пассажа антителами против этих рецепторов. Для флуоресцентной визуализации использовали вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромами Alexa 488, Alexa 546 (“Molecular Probe”, США). В каждом образце анализировали не менее 10⁴ клеток. Анализ проводили на проточном цитометре Cell Lab Quanta SC (“Beckman Coulter”, США).

Для анализа зависимости пролиферации кератиноцитов от концентрации протеазы АПС и пептида АП9 использовали МТТ-тест [12].

Модель ранозаживления in vitro (scratch-тест). Кератиноциты линии HaCat (“CLS Cell Lines Service”, Германия) пассировали в 12-луночные планшеты и культивировали в стандартных условиях до конфлюэнтного монослоя. Раны наносили стерильным наконечником автоматической пипетки путём механического соскабливания участка клеточного монослоя шириной около 1 мм, трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (pH 7,3), затем заливали среду без сыворотки. Для блокирования рецепторов PAR1 или ЭПСР клетки предварительно в течение 60 мин инкубировали с нейтрализующими антителами против этих рецепторов, затем добавляли АПСили АП9. Измеряли ширину ран через 1 ч, 24 ч и 48 ч культивирования.

Для исследования рецепторного механизма действия АП9 и АПС предварительно обрабатывали эпидермальные клетки блокирующими антителами (“Santa Cruz Biotechnology”) к рецепторам PAR1 (АТАР2) и ЭПСР (P20). Рецепторный механизм действия протеазы АПС анализировали по включению метки бромдезоксисуридина (BrdU, “Sigma”) в ДНК пролиферирующих клеток. Для этого клетки инкубировали сутки в среде, содержащей 10 мМ BrdU и исследуемые агенты, затем клетки фиксировали и выявляли клетки, включившие метку, с помощью антител против BrdU (“BD PharMingen”, Нидерланды) по методике производителя антител.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Prism 5 (GraphPad) и непараметрического критерия Kruskal–Wallis.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Большая часть популяции первичных кератиноцитов коэкспрессирует рецепторы ПАР1 и ЭПСР (59,5±11,8%), 15,1±8,7% клеток экспрессируют только рецептор ЭПСР, 17,6±9,1% клеток экспрессируют только рецептор ПАР1 и 7,6±3,2% клеток не экспрессируют эти рецепторы (рис. 1).

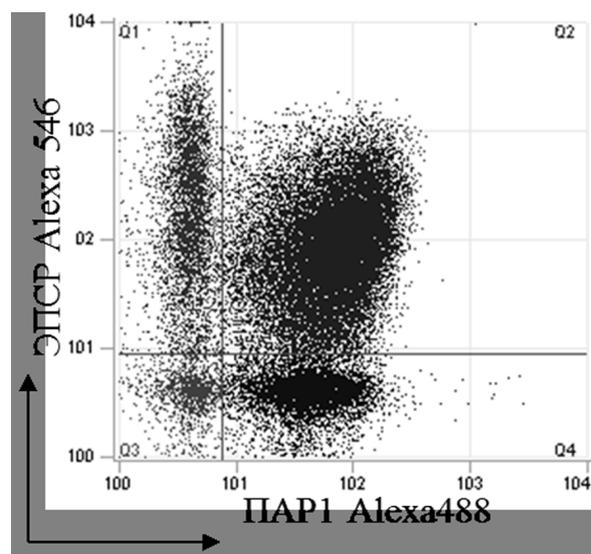


Рисунок 1. Количественный анализ экспрессии рецепторов ПАР1 и ЭПСР методом проточной цитометрии. Q1 - ЭПСР+ПАР1- клетки; Q2 - ЭПСР+ПАР1+ клетки; Q3 - ЭПСР-ПАР1- клетки; Q4 - ЭПСР-ПАР1+ клетки [7,5 см].

В работе мы сравнили влияние нового неканонического пептида ПАР1 – пептида 9 (АП9), аналога “привязанного лиганда” рецептора ПАР1, освобождаемого АПС, и протеазы АПС на пролиферацию кератиноцитов. Протеаза АПС в диапазоне концентраций 0,01-100 нМ стимулировала пролиферацию кератиноцитов. Однако чёткого максимума пролиферации не выявлено: уровень пролиферации при действии 0,01 нМ и 1 нМ АПС составил 122,4±9,9% и 137,6±6,9% соответственно. При действии высокой концентрации АПС (100 нМ) выявлено снижение уровня пролиферации в среднем на 24% по сравнению с действием 1 нМ АПС. При этом уровень пролиферации оставался достоверно выше уровня пролиферации клеток в контроле (рис. 2). Впервые показано, что пептид АП9 в концентрациях 0,1-10 мкМ повышал уровень пролиферации клеток,

подобно АПС. Максимум увеличения уровня пролиферации кератиноцитов наблюдали при действии 10 мкМ пептида АП9 (144,3±10,8%), а в высокой концентрации АП9 (100 мкМ) отмечено снижение уровня пролиферации (рис. 2).

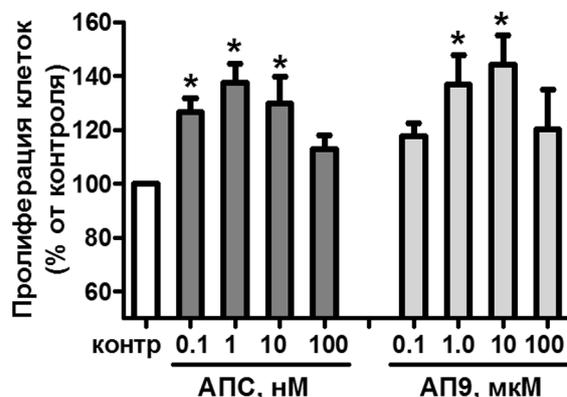


Рисунок 2. Влияние активированного протеина С (АПС) (0,01-100 нМ) и пептида АП9 (0,1-100 мкМ) на пролиферацию первичных кератиноцитов человека (МТТ-тест). * - $p < 0,05$ относительно уровня пролиферации в контроле (0 нМ АПС и 0 мкМ АП9), $n=6$ [7,5 см].

Для оценки влияния протеазы АПС и пептида АП9 на процесс заживления ран мы использовали модель раны эпителиального пласта *in vitro*. Размер ран при действии 1 нМ АПС через 48 часов существенно снижался и составил 388,9±51,9 мкм, а при действии 10 мкМ пептида АП9 – 546,2±112,6 мкм, тогда как в контроле размер ран достигал 888,9±116,7 мкм (рис. 3). Таким образом, протеаза АПС и пептид АП9 ускоряют закрытие ран эпителиального пласта.

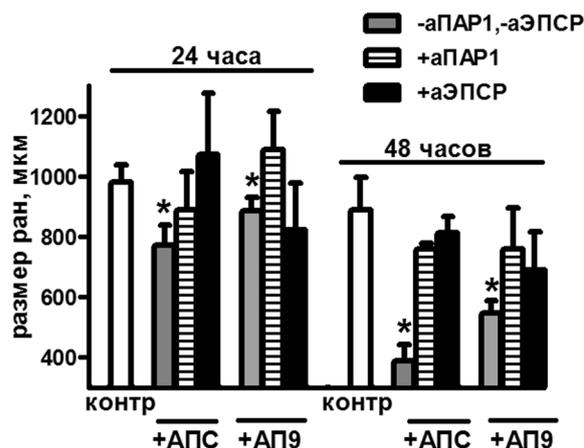


Рисунок 3. Изменение размера ран эпителиального пласта при действии АПС (1 нМ) или АП9 (10 мкМ) и блокирующих рецепторы антител - анти-ПАР1 (аПАР1) и анти-ЭПСР (аЭПСР). Клетки инкубировали 60 мин с антителами против рецепторов и затем добавляли 1 нМ АПС или 10 мкМ АП9. * - $p < 0,05$ (относительно контроля), $n=5$ [7,5 см].

НОВЫЙ ПЕПТИД-АГОНИСТ PAR1 СТИМУЛИРУЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЕРАТИНОЦИТОВ

Для исследования рецепторного механизма ранозаживляющего действия АП9 в сравнении с действием протеазы АПС предварительно обрабатывали эпидермальные клетки блокирующими антителами к рецепторам PAR1 (ATAP2) и ЭПСР (P20). Установлено, что антитела, блокирующие рецептор PAR1 (аPAR1) и антитела к ЭПСР (аЭПСР) отменяют пролиферативное действие 1 нМ АПС и 10 мкМ АР9 на клетки (рис. 3).

Предварительная обработка кератиноцитов человека антителами, блокирующими PAR1 и ЭПСР, отменяла стимулирующее пролиферацию действие 10 мкМ пептида АР9 (рис. 4). Подобным образом, блокирование рецепторов PAR1 и ЭПСР кератиноцитов перед нанесением 1 нМ АПС снижало количество клеток, включивших метку BrdU, до контрольных значений. Обработка клеток антителами против рецептора PAR3 (H103) и контрольными, неблокирующими PAR1 антителами (S19), не влияла на активацию пролиферации, вызванную АПС (рис. 4). Наши данные о зависимости PAR1-опосредованного пролиферативного действия АПС на кератиноциты и о корцепторных взаимодействиях PAR1 и ЭПСР подтверждают ранее полученные результаты [1, 5].

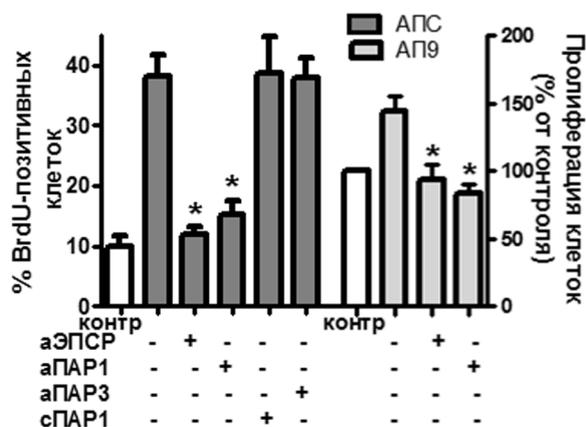


Рисунок 4. Влияние блокирующих антител против рецепторов PAR1 (ATAP2), PAR3 (H103) и ЭПСР (P20) и не блокирующего PAR1 антитела (S19) на вызванную 1 нМ АПС пролиферацию кератиноцитов, анализируемую по количеству клеток, включивших метку BrdU, и влияние блокирующих антител против рецепторов PAR1 и ЭПСР на пролиферацию кератиноцитов (MTT-тест), индуцируемую пептидом АР9 (10 мкМ). Клетки инкубировали 60 мин с антителами против рецепторов и затем добавляли 10 мкМ АР9 или 1 нМ АПС. * - $p < 0,05$ относительно уровня пролиферации в контроле (0 мкМ АР9), $n=5$ [7,5 см].

Таким образом, в нашей работе впервые показано, что неканонический лиганд PAR1, синтетический пептид АР9 (NPNDKYEPF амид), подобно протеазе АПС, стимулирует пролиферативную активность кератиноцитов человека, но в концентрации на несколько порядков выше концентрации протеазы АПС. Подобное соотношение концентраций также характерно для эффективных концентраций канонического пептида-агониста PAR1-TRAP, и протеазы тромбина, необходимых для их провоспалительного действия на клетки [13, 14]. Анализ рецепторного механизма действия пептида АР9 на пролиферативную активность кератиноцитов и эпидермальные клетки в сравнении с действием протеазы – АПС, выявил участие PAR1 и корцептора ЭПСР в действии обоих агонистов – АР9 и АПС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе впервые выявлена имитация синтетическим пептидом 9 (NPNDKYEPF амид) – неканоническим лигандом PAR1 – действия АПС на кератиноциты человека, что позволяет надеяться на возможность использования пептида АР9 в дальнейшем при заживлении ран и стимуляции репарации тканей.

Работа осуществляется при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы” по Соглашению № 14.604.21.0017 о предоставлении субсидии от 17 июня 2014 г. “Новые средства для лечения травматических и ишемических повреждений тканей на основе биodeградируемых материалов с иммобилизованными пептидами-агонистами рецепторов, активируемых протеиназами”.

ЛИТЕРАТУРА

- McKelvey K., Jackson C.J., Xue M. (2014) World J. Biol. Chem., **5**(2), 169-179. DOI: 10.4331/wjbc.v5.i2.169.
- Bock F., Shahzad K., Vergnolle N., Isermann B. (2014) Thromb. Haemost., **111**, 610–617. DOI:10.1160/TH13-11-0967.
- van der Poll T., Levi M. (2012) Curr. Vasc. Pharmacol., **10**(5), 632-638. DOI: 10.2174/157016112801784549
- Strukova S. (2006) Front Biosci., **11**, 59-80. DOI: 10.2741/1780
- Xue M., Campbell D., Sambrook P.N., Fukudome K., Jackson C.J. (2005) J. Invest. Dermatol., **125**, 1279-1285. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23952.x

6. Hollenberg M., Compton S. (2002) *Pharmacol. Rev.*, **54**, 203–217.
7. Coughlin S.R. (2000) *Nature*, **407**, 258–264. DOI: 10.1038/35025229
8. Mosnier L.O., Zlokovic B.V., Griffin J.H. (2012) *Int. J. Hematol.*, **95**(4), 333–345. DOI: 10.1007/s12185-012-1059-0.
9. Soh U.J., Trejo J.A. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, E1372–E1380. DOI: 10.1073/pnas.1112482108.
10. Mosnier L.O., Sinha R.K., Burnier L., Bouwens E.A., Griffin J.H. (2012) *Blood*, **120**, 5237–5246. DOI: 10.1182/blood-2012-08-452169.
11. Черных Э.С., Воротеяк Е.А., Ткаченко С.Б., Васильев А.В., Терских В.В. (2007) *Докл. РАН*, **416**, 555–557.
12. Сурин А.М., Горбачева Л.Р., Струкова С.М., Пинелис В.Г., Сторожевых Т.П. (2010) в: *Руководство к экспериментальным работам по физиологии* (под ред. А.Г. Камкина и И.С. Киселевой). ГЭОТАР-Медиа, сс. 141–188.
13. Zhao P., Metcalf M., Bunnnett N.W. (2014) *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **5**, 67–83. DOI: 10.3389/fendo.2014.00067.
14. Ramachandran R., Noorbakhsh F., Defea K., Hollenberg M.D. (2012) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **11**, 69–86. DOI: 10.1038/nrd3615.

Поступила: 31. 10. 2014.

**PEPTIDE-AGONIST OF PROTEASE-ACTIVATED RECEPTOR (PAR 1),
SIMILAR TO ACTIVATED PROTEIN C, PROMOTES PROLIFERATION IN KERATINOCYTES
AND WOUND HEALING OF EPITHELIAL LAYER**

E.V. Kiseleva¹, M.V. Sidorova², L.R. Gorbacheva^{3,4}, S.M. Strukova³

¹Koltzov Institute of Developmental Biology RAS,
26, Vavilova str., Moscow, 119331 Russia; tel.: (499) 135-40-81, 910-417-96-77; fax: (499) 135-80-12;
e-mail: evkiseleva@mail.ru

²Russian Cardiology Research and Production Complex, Moscow, Russia

³Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁴Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Activated protein C (APC) is serine protease hemostasis, independent of its anticoagulant activity, exhibits anti-inflammatory and anti-apoptotic properties that determine the possibility of the protective effects of APC in different diseases, including sepsis and chronic wound healing. APC, binding of endothelial protein C receptor (EPCR) and specifically cleaving PAR1 receptor and releasing peptide agonist PAR1 stabilizes not only endothelial cells, but also many others, including epidermal keratinocytes of the skin. We develop the hypothesis that the cytoprotective effect of APC on the cells, involved in wound healing, seem to imitate peptide - analogous of PAR1 "tethered ligand" that activate PAR1.

In our work, we synthesized a peptide (AP9) – analogue of PAR1 tethered ligand, released by APC, and firstly showed that peptide AP9 (0.1–10 μ M), like to APC (0.01–100 nM), stimulates the proliferative activity of human primary keratinocytes. Using a model of the formation of epithelial wounds *in vitro* we found that peptide AP9, as well as protease APC, accelerates wound healing. Using specific antibodies to the receptor PAR1 and EPCR was studied the receptor mechanism of AP9 action in wound healing compared with the action of APC. The necessity of both receptors – PAR1 and EPCR, for proliferative activity of agonists was revealed. Identified in our work imitation by peptide AP9 – PAR1 ligand, APC acts on keratinocytes suggests the possibility of using a peptide AP9 to stimulate tissue repair.

Key words: peptide agonist, protease-activated receptor, protein C, wound healing, keratinocytes.