

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-221

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО
КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА С БЕЛКОМ S100P
НА ЛИНИИ КЛЕТОК МОНОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА THP-1*

STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING
FACTOR AND S100P PROTEIN ON THE MONOCYTIC LEUKEMIA CELL LINE THP-1

Л. А. Боброва, М. Ю. Земскова

Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пушкино

L. A. Bobrova, M. Y. Zemskova

Institute for Biological Instrumentation RAS, Pushchino

✉ bobrovalola@gmail.com

Аннотация

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) — провоспалительный цитокин, регулирующий дифференцировку моноцитов в макрофаги, также он может участвовать в канцерогенезе. S100P — кальций-связывающий белок, который взаимодействуя с RAGE рецептором, участвует в процессах воспаления, дифференцировке клеток. Нами было установлено, что GM-CSF связывается с S100P. В данной работе изучена биологическая активность этого комплекса.

Abstract

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is a proinflammatory cytokine that regulates the differentiation of monocytes into macrophages; it can also participate in carcinogenesis. S100P is a calcium-binding protein that interacts with the RAGE receptor and assists in the processes of inflammation, proliferation, and differentiation of cells. We have found that GM-CSF binds to S100P. The biological activity of the GM-CSF/S100P complex was investigated in our research.

Рекомбинантные белки S100P и GM-CSF были получены в *E. coli*. Поскольку бактериальные липополисахариды (LPS) могут влиять на жизнеспособность моноцитарных клеток, все белки были проверены на контаминацию LPS методом иммуноферментного анализа. Ранее методом спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса было установлено, что димерная кальций — связанная форма белка S100P — специфически взаимодействует с GM-CSF с образованием стабильного комплекса [1].

Цель данного исследования — определить, проявляет ли обнаруженный комплекс S100P с GM-CSF биологически значимые воздействия на клетки острого моноцитарного лейкоза THP-1. Для этого был проведен тест на определение роста клеток (МТТ-тест) и анализ клеточного цикла в присутствии только GM-CSF, только S100P и предформированного комплекса белков.

Клетки THP-1 были обработаны 20 нг/мл GM-CSF или 20/100/500/700/1000/2000 нг/мл S100P или их комбинациями в течение 48 ч.

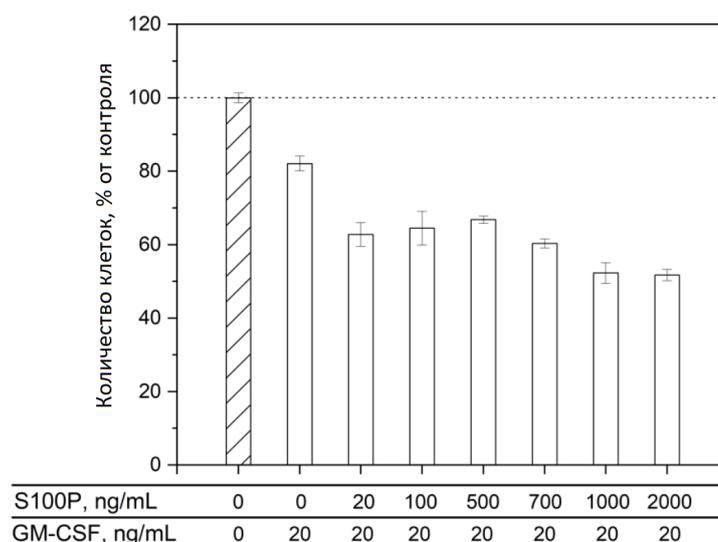


Рис. 1. Изменение количества МТТ-положительных клеток THP 1 относительно необработанного контроля в ответ на экзогенный GM-CSF (20 нг/мл) или его комбинацию с S100P (20–2000 нг/мл). Стандартные отклонения указаны

* Исследование выполнено при поддержке РФФ (проект № 19-14-00289).
© Л. А. Боброва, М. Ю. Земскова, 2024

После этого количество жизнеспособных клеток анализировали посредством МТТ-теста. На рис. 1 представлены усредненные данные из 4 независимых экспериментов. Было показано, что добавление 20 нг/мл GM-CSF снижает количество живых клеток в среднем на 20 % относительно контроля, экзогенный S100P — на 12–22 %, а при совместной обработке численность клеток снижается на 35–40 %. Это может быть как аддитивным эффектом двух белков, так и действием их преформированного комплекса.

Для выяснения возможных механизмов действия экзогенных белков и их комплекса на рост клеток ТНР-1, наблюдаемого в МТТ-тесте, с помощью проточной цитометрии был проведен анализ распределения клеток, обработанных GM-CSF, S100P и их комплексом, по фазам клеточного цикла. Результаты показали, что GM-CSF вызывает замедление клеточного цикла, поскольку наблюдается увеличение клеток в фазе G1 (38 %), с одновременным уменьшением популяции клеток в S (22 %) и G2-фазе (10 %) относительно необработанного контроля (в контроле G1 — 32 %, S — 30 % и G2 — 12 %). В то же время экзогенный S100P в концентрациях 20–700 нг/мл не влияет на клеточный цикл клеток ТНР-1.

После инкубации клеток с комплексом S100P/GM-CSF (соотношение 1 : 1, 20 нг/мл) наблюдается еще большее замедление клеточного цикла, чем при действии только GM-CSF. Так, количество клеток в фазе G1 составило 45 %, S — 15 % и G2 — 8 % (рис. 2). Учитывая отсутствие эффекта S100P на клеточный цикл, эти данные указывают на биологическую активность комплекса, предполагая, что S100P, будучи связанным с GM-CSF, усиливает его ингибирующее действие на деление клеток. Кроме того, следует отметить, что и GM-CSF, и S100P вызывают увеличение популяции subG1, отражающей апоптоз. При этом при совместном действии белков это значение увеличивается соответственно (рис. 3). Поэтому в случае инициации клеточной гибели можно предположить аддитивный эффект двух белков, а не их комплекса. Следовательно, уменьшение количества жизнеспособных клеток, определенное посредством МТТ-теста после обработки клеток ТНР-1 экзогенными белками или их комплексом, отражает как замедление клеточного цикла, в результате действия GM-CSF или комплекса GM-

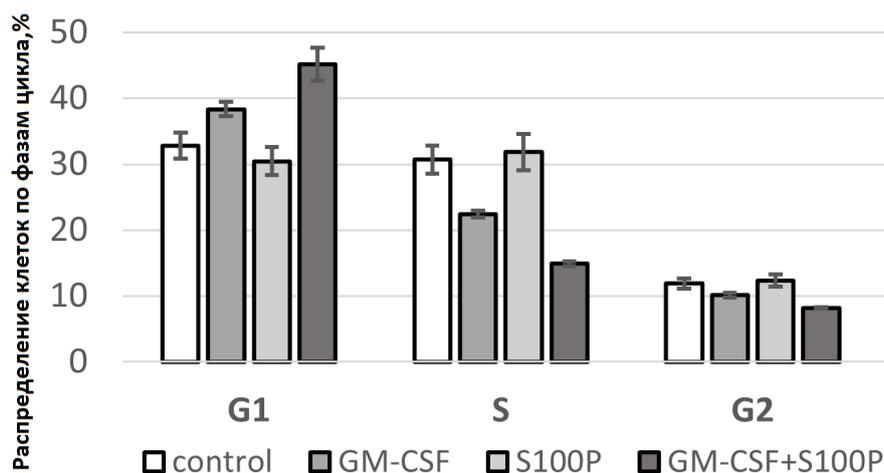


Рис. 2. Влияние S100P, GM-CSF и их комплекса на цикл клеток ТНР-1

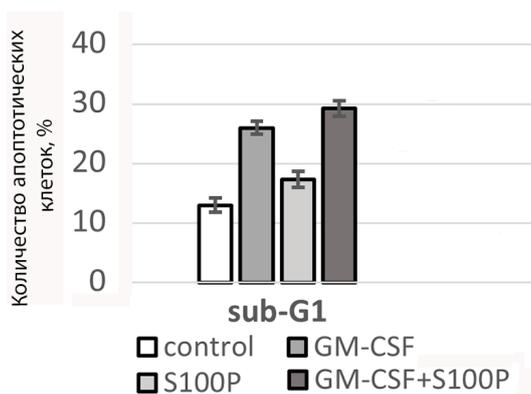


Рис. 3. Апоптотическая гибель клеток ТНР-1 в результате действия S100P, GM-CSF или их комплекса

CSF/S100P, так и инициацию клеточной гибели, вызванной экзогенными белками. Процессы замедления клеточного деления и частичный апоптоз наблюдаются в культурах первичных моноцитов при добавлении GM-CSF, который инициирует их дифференцировку в макрофаги. Хотя для immortalized моноцитарных клеток THP-1 действие только GM-CSF не вызывает их переход в макрофаги, можно предположить частичную инициацию их дифференцировки, и в таком случае комплекс GM-CSF/S100P усиливает этот процесс. Доказательство этой гипотезы является целью наших дальнейших исследований.

Литература

1. Kazakov A. S., Rastrygina V. A., Vologzhannikova A. A. et al. Recognition of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by specific S100 proteins // *Cell Calcium*. 2024. Vol. 119. P. 102869.