

БИОЛОГИЯ**BIOLOGY**

УДК 577.352.4

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-460-464>

Поступило в редакцию 14.02.2024

Received 14.02.2024

В. А. Урбан, Ф. О. Константинов, В. Г. Вересов*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь***КОНФОРМАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ БЕЛКА HVEM
ПРИ ЕГО ЦИС- И ТРАНС-СВЯЗЫВАНИИ С БЕЛКОМ BTLA***(Представлено членом-корреспондентом Е. И. Слобожаниной)*

Аннотация. Активация Т-клеток начинается при распознавании антигена Т-клеточным рецептором и регулируется сигналами, генерируемыми коstimулирующими и коinгибирующими молекулами. Эти молекулы, называемые иммунными контрольными точками (иммунными чекпойнтами), являются привлекательными терапевтическими мишенями для иммунотерапии рака и аутоиммунных заболеваний. Коингибиторный сигнальный путь, образуемый между TNF-рецептором HVEM (HerpesVirus Entry Mediator, TNFRSF14) и BTLA (B and T Lymphocyte Attenuator), ограничивает активацию Т-клеток. Однако BTLA может также служить активирующим лигандом для HVEM при его транс-взаимодействии с BTLA, находящимся на соседней клетке. Эксперименты с использованием мутагенеза показали, что HVEM и BTLA как при цис-, так и при транс-связывании обладают идентичными контактными поверхностями, что предполагает наличие значительных конформационных перестроек в стволовых областях между эктодоменом и трансмембранным доменом белка HVEM при переходе от цис- к транс-связыванию с белком BTLA. Однако из-за технических сложностей кристаллизации рецепторов на поверхности клеток, обладающих длинными стволовыми участками, атомистические 3D-структуры HVEM в цис- и транс-состоянии, а также атомистические 3D-структуры полноцепочечных цис- и транс-комплексов между HVEM и BTLA до настоящего времени неизвестны. В настоящей работе с использованием подходов биоинформатики установлены структуры полноцепочечных белков HVEM и BTLA и их комплексов при их цис- и транс-взаимодействии. Полученные результаты могут быть использованы при разработке иммунорегуляторов для лечения рака и аутоиммунных заболеваний.

Ключевые слова: Т-клетка, иммунные контрольные точки, HVEM, BTLA, цис- и транс-связывание

Для цитирования. Урбан, В. А. Конформационные особенности белка HVEM при его цис- и транс-связывании с белком BTLA / В. А. Урбан, Ф. О. Константинов, В. Г. Вересов // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 6. – С. 460–464. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-460-464>

Viktor A. Urban, Frants O. Kanstantinau, Valery G. Veresov*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus***CONFORMATIONAL FEATURES OF HVEM PROTEIN UPON ITS CIS
AND TRANS BINDING TO BTLA PROTEIN***(Communicated by Corresponding Member Ekaterina I. Slobozhanina)*

Abstract. T-cell activation begins upon antigenic recognition by T-cell receptor and is regulated by signals generated by co-stimulating and co-inhibiting molecules. These molecules, known as immune checkpoints, are attractive therapeutic targets for the therapy of cancer and autoimmune diseases. Co-inhibiting signal pathway formed between TNF-receptor HVEM (HerpesVirus Entry Mediator, TNFRSF14) and BTLA (B and T Lymphocyte Attenuator) limits T-cell activation. However, BTLA can serve also as activating ligand when interacts with HVEM on adjacent cell. Mutagenesis experiments have shown that the same interface is formed between HVEM and BTLA both upon cis and trans interactions thus suggesting significant conformational re-

arrangement in the HVEM stalk region between ectodomain and transmembrane domains upon transfer from cis to trans binding to BTLA. However, because of technical problems of the crystallization of surface receptor with long stalks, HVEM atomistic 3D-structures including stalk region are absent up to now. In this study, the approaches of structural bioinformatics were used to determine the structures of full-length proteins HVEM and BTLA and their complexes upon cis- and trans-interactions. The results obtained can be used upon developing immunoregulators for the immunotherapy of cancer and autoimmune diseases.

Keywords: T-cell, immune checkpoints, HVEM, BTLA, cis and trans binding

For citation. Urban V. A., Kanstantinau F. O., Veresov V. G. Conformational features of HVEM protein upon its cis and trans binding to BTLA protein. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 6, pp. 460–464 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-460-464>

Введение. Представитель суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (РФНО, TNFRSF) HVEM (HerpesVirus Entry Mediator, TNFRSF14) регулирует иммунный ответ Т-клеток, активируя как воспалительный, так и ингибиторный сигнальные пути [1; 2]. HVEM является уникальным представителем суперсемейства РФНО, действуя и как рецептор ФНО-подобных лигандов, и как лиганд для белка иммуноглобулинового суперсемейства BTLA (B and T Lymphocyte Attenuator), что отличает HVEM от других иммунорегулирующих молекул. Клеточный контекст, в рамках которого HVEM связывается с BTLA, определяет будет ли клеточный ответ активирующим или ингибирующим. При экспрессии на различных иммунных клетках (транс-взаимодействие) связывание BTLA с HVEM является активирующим для HVEM и BTLA, в то время как связывание на одной клетке (цис-взаимодействие) является ингибирующим [3; 4]. Эксперименты с использованием мутагенеза показали, что HVEM и BTLA, как при цис-, так и при транс-связывании обладают идентичным интерфейсом [4], что предполагает наличие значительных конформационных перестроек в шарнирных областях между эктодоменом и трансмембранным доменом белка HVEM при переходе от цис-связывающего белка к транс-связывающему, однако локализация шарнирных областей и атомные структуры образующихся комплексов неизвестны. В настоящей работе осуществлены моделирование цис- и транс-комплексов между белками HVEM и BTLA и идентификация шарнирных областей белка HVEM.

Материалы и методы исследования. Предсказание атомистических 3D-структур белка BTLA и цис- и транс-структур белка HVEM осуществляли с использованием программы ассемблирования доменов DeepAssembly [5]. Разделение на домены, необходимое для работы программы DeepAssembly, осуществляли следующим образом. В качестве одного из доменов в каждом из трех случаев рассматривали внеклеточные сегменты белков, известные из рентгеноструктурного анализа (сегмент BTLA, включающий остатки 26–137, сегмент HVEM, включающий остатки 39–139), а также N-концевые домены, предшествующие эктодоменам с экспериментально установленной структурой (остатки 1–25 для BTLA и 1–38 для HVEM), трансмембранные домены (остатки 158–178 для BTLA и 203–223 для HVEM) и цитозольные домены (остатки 179–189 для BTLA и 224–283 для HVEM). Разделение белка на домены внутри сегментов белков в промежутке между сегментами с экспериментально установленной структурой и трансмембранными доменами осуществляли с использованием программ FUPred [6] и ThreaDom [7]. Установление шарнирных областей осуществляли с использованием программ LGA-GDT [8] и DynOmics [9]. Переход из цис-конформации в транс- исследовали с помощью программы KOSMOS [10], позволяющей оценить энергетический барьер между двумя конформациями.

Результаты и их обсуждение. В результате выполнения протокола разделения белка BTLA на домены были сформированы следующие домены: остатки 1–25 (домен 1); остатки 26–137 (домен 2, структура определена посредством рентгеноструктурного анализа); остатки 138–157 (домен 3); остатки 158–178 (домен 4, трансмембранный домен); остатки 179–289 (домен 5, цитозольный домен). Для белка HVEM-транс были сформированы домены: остатки 1–38 (домен 1); остатки 39–139 (домен 2, имеется экспериментальная структура для этого домена); остатки 140–154 (домен 3); остатки 155–189 (домен 4); остатки 190–202 (домен 5); остатки 203–223 (домен 6; трансмембранный домен); остатки 224–283 (домен 7; цитозольный домен). Для белка HVEM-цис остатки 140–202 рассматривали как единый домен. В результате HVEM-цис рассматривали как 5-доменный белок. Результаты расчета 3D-структуры белков BTLA, HVEM-цис, HVEM-транс с использованием программы DeepAssembly приведены на рис. 1. С использованием программ LGA-GDT [8] и DynOmics [9] были определены шарнирные области белка HVEM, ответствен-

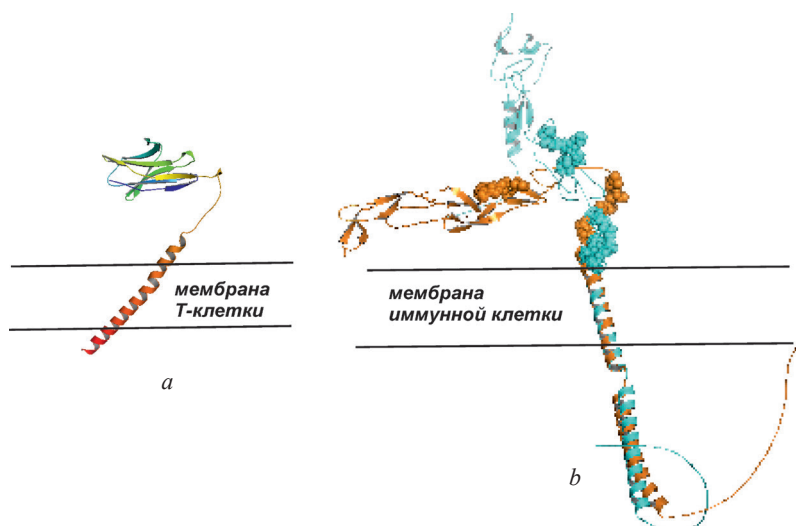


Рис. 1. Структурные модели белков BTLA и HVEM в мембранном окружении. Приведено изображение белка BTLA (*a*) и белка HVEM (*b*). Цис-конформация белка HVEM изображена коричневым цветом, транс-конформация показана в бирюзовом цвете. Шарнирные области белка HVEM показаны сферами. Иммунные HVEM⁺ клетки – иммунные клетки, экспрессирующие HVEM (Т-клетки, дендритные клетки, регуляторные Т-клетки, В-клетки)

Fig. 1. Structural models of BTLA and HVEM in the membrane environment. Shown are BTLA (*a*) and HVEM (*b*). HVEM cis-conformation and trans-conformation are depicted in brown and cyan, respectively. HVEM hinge regions are shown as spheres. HVEM⁺ immune cells stand for HVEM expressing immune cells

ные за переход белка из цис- в транс-конформацию. Такими оказались области белка 150VQG-GT155 (шарнир 1) и 188LVTKAGAGTS196 (шарнир 2) (рис. 1).

Структурная суперпозиция полноцепочечных белков HVEM (цис- и транс-) и BTLA на структуру комплекса эктодоменов двух белков, полученную с использованием рентгеноструктурного анализа (PDB-код: 2AW2), позволила предсказать атомистические цис- и транс-комплексы белков HVEM и BTLA (рис. 2).

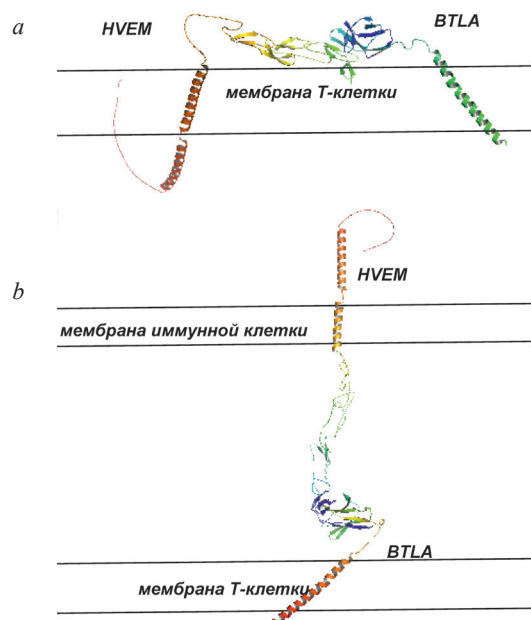


Рис. 2. Структурные модели полноцепочечных цис- и транс-комплексов белка BTLA и HVEM: *a* – структурная модель цис-комплекса; *b* – структурная модель транс-комплекса.

Под иммунной клеткой на рисунке *b* подразумевается любая иммунная клетка экспрессирующая белок HVEM

Fig. 2. Structural models of the full-length cis- and trans- BTLA/HVEM complexes. Shown are: structural models of the cis-complex (*a*) and of the trans-complex (*b*)

Анализ конформационной перестройки белка HVEM при переходе из транс-конформации в цис-конформацию с использованием нормальных мод и программы KOSMOS [10] показал наличие двух высоких энергетических барьеров при транс-цис-переходе белка HVEM. Динамика энергетической оценочной функции при переходе из цис- в транс-конформацию приведена на рис. 3. На рисунке видно наличие значительного энергетического барьера при переходе от цис- к транс-конформации, что позволяет предположить сосуществование двух популяций белков HVEM с цис- и транс-конформациями уже после посттрансляционного сворачивания.

Заключение. Полученные результаты позволяют предположить изгиб белка HVEM в его стволовой области, включающей домены CRD3 (сегмент 150VQGGT155; шарнир 1) и CRD4 (сегмент 188LVTKAGAGTS196; шарнир 2). Транс- и цис-конформации соответствуют двум глубоким потенциальным ямам в энергетическом ландшафте белка, что позволяет предположить образование двух различных конформаций и популяций белка HVEM (цис- и транс-) при его посттрансляционном сворачивании.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б22-016).

Acknowledgements. The work has been sponsored by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Grant Б22-016).

Список использованных источников

1. Beyond the anti-PD-1/PD-L1 era: promising role of the BTLA/HVEM axis as a future target for cancer immunotherapy / C. Sordo-Bahamonde [et al.] // *Mol. Cancer*. – 2023. – Vol. 22. – Art. 142. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01845-4>
2. Steinberg, M. W. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation / M. W. Steinberg, T. C. Cheung, C. F. Ware // *Immunol. Rev.* – 2011. – Vol. 244, N 1. – P. 169–187. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.2011.01064.x>
3. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival / T. C. Cheung TC [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol. 106, N 15. – P. 6244–6249. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902115106>
4. T cell intrinsic heterodimeric complexes between HVEM and BTLA determine receptivity to the surrounding micro-environment / T. C. Cheung [et al.] // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183, N 11. – P. 7286–7296. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902490>
5. Multi-domain and complex protein structure prediction using inter-domain interactions from deep learning / Y. Xia [et al.] // *Commun. Biol.* – 2023. – Vol. 6. – Art. 1221. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05610-7>
6. FUpred: detecting protein domains through deep-learning-based contact map prediction / W. Zheng [et al.] // *Bioinformatics*. – 2020. – Vol. 36, N 12. – P. 3749–3757. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa217>
7. ThreaDom: Extracting Protein Domain Boundary Information from Multiple Threading Alignments / Z. Xue [et al.] // *Bioinformatics*. – 2013. – Vol. 29, N 13. – P. i247–i256. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt209>
8. Zemla, A. LGA: A method for finding 3D similarities in protein structures / A. Zemla // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – Vol. 31, N 13. – P. 3370–3374. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg571>
9. DynOmics: dynamics of structural proteome and beyond / H. Li [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – Vol. 45, N W1. – P. W374–W380. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx385>
10. Seo, S. KOSMOS: a universal morph server for nucleic acids, proteins and their complexes / S. Seo, M. K. Kim // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Vol. 40, N W1. – P. W531–W536. <https://doi.org/10.1093/nar/gks525>

References

1. Sordo-Bahamonde C., Lorenzo-Herrero S., Granda-Díaz R., Martínez-Pérez A., Aguilar-García C., Rodrigo J. P., García-Pedrero J. M., Gonzalez S. Beyond the anti-PD-1/PD-L1 era: promising role of the BTLA/HVEM axis as a future target for cancer immunotherapy. *Molecular Cancer*, 2023, vol. 22, art. 142. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01845-4>
2. Steinberg M. W., Cheung T. C., Ware C. F. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. *Immunological Reviews*, 2011, vol. 244, no. 1, pp. 169–187. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.2011.01064.x>

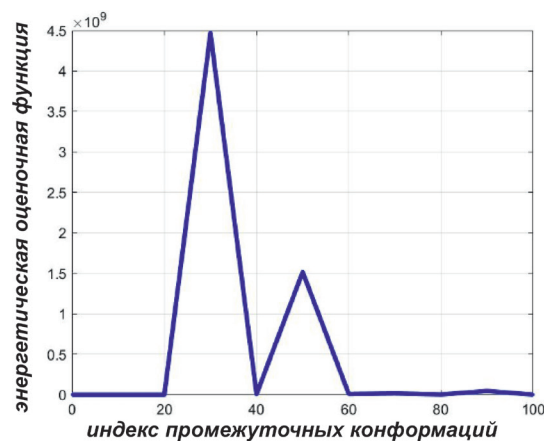


Рис. 3. Изменения безразмерной энергетической оценочной функции KOSMOS при переходе белка HVEM из цис- в транс-конформацию

Fig. 3. Changes of the dimensionless KOSMOS energy scoring function upon the transfer of the HVEM protein from cis to trans conformation

3. Cheung T. C., Steinberg M. W., Osborne L. M., Macauley M. G., Fukuyama S., Sanjo H., D'Souza C., Norris P. S., Pfeffer K., Murphy K. M., Kronenberg M., Spear P. G., Ware C. F. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, vol. 106, no. 15, pp. 6244–6249. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902115106>
4. Cheung T. C., Osborne L. M., Steinberg M. W., Macauley M. G., Fukuyama S., Sanjo H., D'Souza C., Norris P. S., Pfeffer K., Murphy K. M., Kronenberg M., Spear P. G., Ware C. F. T cell intrinsic heterodimeric complexes between HVEM and BTLA determine receptivity to the surrounding microenvironment. *Journal of Immunology*, 2009, vol. 183, no. 11, pp. 7286–7296. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902490>
5. Xia Y., Zhao K., Liu D., Zhou X., Zhang G. Multi-domain and complex protein structure prediction using inter-domain interactions from deep learning. *Communications Biology*, 2023, vol. 6, art. 1221. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05610-7>
6. Zheng W., Zhou X., Wuyun Q., Pearce R., Li Y., Zhang Y. FUPred: detecting protein domains through deep-learning-based contact map prediction. *Bioinformatics*, 2020, vol. 36, no. 12, pp. 3749–3757. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa217>
7. Xue Z., Xu D., Wang Y., Zhang Y. ThreaDom: extracting protein domain boundary information from multiple threading alignments. *Bioinformatics*, 2013, vol. 29, no. 13, pp. i247–i256. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt209>
8. Zemla A. LGA: A method for finding 3D similarities in protein structures. *Nucleic Acids Research*, 2003, vol. 31, no. 13, pp. 3370–3374. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg571>
9. Li H., Chang Y. Y., Lee J. Y., Bahar I., Yang L. W. DynOmics: dynamics of structural proteome and beyond. *Nucleic Acids Research*, 2017, vol. 45, no. W1, pp. W374–W380. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx385>
10. Seo S., Kim M. K. KOSMOS: a universal morph server for nucleic acids, proteins and their complexes. *Nucleic Acids Research*, 2012, vol. 40, no. W1, pp. W531–W536. <https://doi.org/10.1093/nar/gks525>

Информация об авторах

Урбан Виктор Андреевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: urban@ibce.by.

Константинов Франц Олегович – аспирант. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: frantskanstantin@ibce.by.

Вересов Валерий Гаврилович – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: veresov@ibce.by.

Information about the authors

Urban Viktor A. – Ph. D. (Biology), Senior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: urban@ibce.by.

Kanstantinau Frants O. – Postgraduate Student. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: frantskanstantin@ibce.by.

Veresov Valery G. – D. Sc. (Biology), Chief Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: veresov@ibce.by.