

УДК 571.27; 57.016.4

Роль рекомбинантного циклофилина А человека в развитии противоопухолевого иммунного ответа

А. А. Калинина¹, Ю. Ю. Силаева², Д. Б. Казанский¹, Л. М. Хромых^{1*}¹«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения России, 115478, Москва, Каширское ш., 24²Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

*E-mail: lkhromykh@list.ru

Поступила в редакцию 13.02.2019

Принята к печати 13.05.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-63-67

РЕФЕРАТ Циклофилин А (ЦфА) – многофункциональный белок, обладающий изомеразной активностью и существующий во внутриклеточной и секретируемой формах. Секретируемый ЦфА способствует регенерации кроветворной и иммунной систем организма, усиливая миграцию стволовых клеток из костного мозга. В настоящее время разрабатываются стратегии применения ЦфА при ишемии конечностей, для устранения побочных эффектов циклоспорина А (ЦсА) и др. Однако роль ЦфА в развитии противоопухолевого иммунного ответа не изучена. Используя модельную систему отторжения лимфомы EL-4 мышами B10.D2(R101), нами показано, что рекомбинантный ЦфА человека стимулирует противоопухолевый иммунный ответ за счет раннего привлечения гранулоцитов в сайт локализации клеток-мишеней и ускоренного системного накопления эффекторных Т-киллерных клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА провоспалительный фактор, противоопухолевый иммунный ответ, трансгенные мыши, Т-клеточный рецептор, циклофилин А.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЦфА – циклофилин А; ЦсА – циклоспорин А; рЦфА – рекомбинантный циклофилин А человека; ТКР – Т-клеточный рецептор; МНС – главный комплекс гистосовместимости; PBS – фосфатно-солевой буфер; i.p. – внутрибрюшинное введение; АПК – антигенпредставляющие клетки; CD – кластер дифференцировки.

ВВЕДЕНИЕ

Циклофилин А (ЦфА) – белок семейства пептидил-пролилизомераз, существующий во внутриклеточной и секретируемой формах. Цитозольный ЦфА присутствует во всех тканях и выполняет множество функций [1]. ЦфА участвует в проведении сигнала через Т-клеточный рецептор [1] и служит лигандом для циклоспорина А, за счет чего и реализуется иммуносупрессорное действие последнего [1].

Секретируемый ЦфА является провоспалительным фактором, он привлекает клетки врожденного иммунитета (гранулоциты, макрофаги, дендритные клетки) в очаг воспаления и участвует в патогенезе различных заболеваний [1]. Будучи хемоаттрактантом стволовых клеток, а также незрелых гранулоцитов, предшественников дендритных клеток, Т- и В-лимфоцитов, и индуцируя их миграцию из костного мозга на периферию, секретируемый

ЦфА осуществляет регенеративные функции [2]. ЦфА способен регулировать действие других хемокинов и продукцию провоспалительных цитокинов [3]. ЦфА индуцирует дифференцировку и созревание дендритных клеток, а также захват и представление антигена этими клетками [4]. Таким образом, ЦфА может быть фактором модуляции как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Накапливающиеся экспериментальные данные указывают на потенциальную возможность применения данного белка при таких заболеваниях, как ишемия конечностей, устранение побочных эффектов, вызванных действием циклоспорина А, вирусных заболеваний и др.

Однако роль ЦфА в индукции и развитии противоопухолевого иммунного ответа остается малоизученной. Цель нашей работы состояла в оценке вклада ЦфА как фактора иммунитета, участвующего в начальных этапах развития противоопухолевого

иммунного ответа. Определено влияние рекомбинантного ЦфА человека (рчЦфА) на отторжение лимфомы EL-4 мышами B10.D2(R101). Выявлено иммуномодулирующее действие рчЦфА, направленное на стимуляцию врожденного и адаптивного звеньев иммунитета и, как следствие, на ускоренную элиминацию опухолевых клеток. Кроме того, в модели формирования противоопухолевого иммунного ответа у мышей трансгенной линии 1D1b [5] на клетки лимфомы EL-4 показана роль рчЦфА в стимуляции накопления опухолевых специфических цитотоксических Т-лимфоцитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мыши

Мышей линий C57BL/6 ($K^bI-A^bD^b$) и B10.D2(R101) ($K^dI-A^dI-E^dD^b$) получали из экспериментально-биологической лаборатории НИИ ЭДИТО НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Трансгенные мыши линии 1D1b, в Т-лимфоцитах которых экспрессируются β -цепи Т-клеточного рецептора (ТКР) клеток памяти, специфичного к молекуле главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I H-2K^b, выведены на генетической основе линии B10.D2(R101) в лаборатории механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина [5]. В исследованиях использовали самцов и самок массой 16–18 г. Экспериментальные группы включали 6–8 животных. Работу с животными проводили в соответствии с протоколом этической комиссии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России.

Получение рчЦфА

Белок выделяли из биомассы клеток *Escherichia coli* BL21(DE3)Gold, трансформированных рекомбинантной плазмидой pETCYPori, содержащей полноразмерный ген ЦфА человека [6]. рчЦфА использовали в виде раствора в натрий-калий фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7.3) с чистотой более 95% по данным электрофореза. По результатам LAL-теста содержание эндотоксина в образцах рчЦфА не превышало 0.038 нг/мг белка.

Иммунизация животных

Мышей линии B10.D2(R101) и 1D1b иммунизировали внутрибрюшинно (i.p.) клетками лимфомы EL-4 (K^bD^b) в количестве 3.0×10^5 и 1.0×10^6 клеток/мышь соответственно в 500 мкл PBS.

Схемы введения рчЦфА

Мышам линии B10.D2(R101) вводили белок i.p. в дозе 5 мг/кг (100 мкг/мышь) в течение 3 дней после им-

мунизации лимфомой EL-4. Первую инъекцию белка проводили через 3 ч после имплантации клеток EL-4. Мышам линии 1D1b вводили 10 мг/кг рчЦфА подкожно в течение 10 дней после иммунизации. Контрольным животным вводили PBS в качестве плацебо.

Подготовка суспензий клеток

Через 6, 9 и 12 дней после иммунизации мышей линии B10.D2(R101) умерщвляли путем цервикальной дислокации. Для получения лаважа проводили смыв брюшной полости 2 мл PBS при помощи шприца. Для получения суспензии спленоцитов извлекали селезенку и гомогенизировали в 3 мл PBS в гомогенизаторе Поттера. Трансгенных мышей 1D1b умерщвляли на 12 день после иммунизации и подготавливали суспензию спленоцитов аналогичным образом. Лизис эритроцитов проводили в лизирующем буфере (BD, США), затем отмывали клетки в PBS и осаждали центрифугированием (200 g, 5 мин). Жизнеспособные клетки подсчитывали в камере Горяева в присутствии трипанового синего и эозина.

Антитела

В работе использовали моноклональные антитела: анти-CD3 ϵ – eFluor450 (клон 17A2) (eBioscience, США); анти-CD8 – Pacific blue (клон 53-6.7) (BD Pharmingen, США); анти-CD44 – APC (клон IM7) (eBioscience, США); анти-CD62L-APC – Cy7 (клон MEL-14) (eBioscience, США); анти-Vb6 – PE (клон RR4-7) (eBioscience, США); анти-Gr1 – APC (клон RB6-8C5) (BD Pharmingen, США); анти-CD11b-PE – Cy7 (клон M1/70) (BD Pharmingen, США).

Цитофлуориметрический анализ

Пробы клеток лаважа и селезенки ($1.0\text{--}5.0 \times 10^6$) обрабатывали антителами Fc block (клон 2.4G2, BD Pharmingen, США) в течение 5 мин при 4°C и инкубировали с моноклональными антителами нужной специфичности в течение 40 мин при 4°C. Клетки отмывали PBS путем центрифугирования (200 g, 5 мин) и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS CantoII (BD, США) с использованием программы FACSDiva 6.0. Мертвые клетки исключали из анализа по окрашиванию йодидом пропидия (BD, США). Для характеристики популяций анализировали $0.5\text{--}1.0 \times 10^6$ событий. Обработку результатов проводили в программе FlowJo 7.6. (BD, США).

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента в программе Exel (Microsoft, США). Различия признавали значимыми при $p \leq 0.05$.

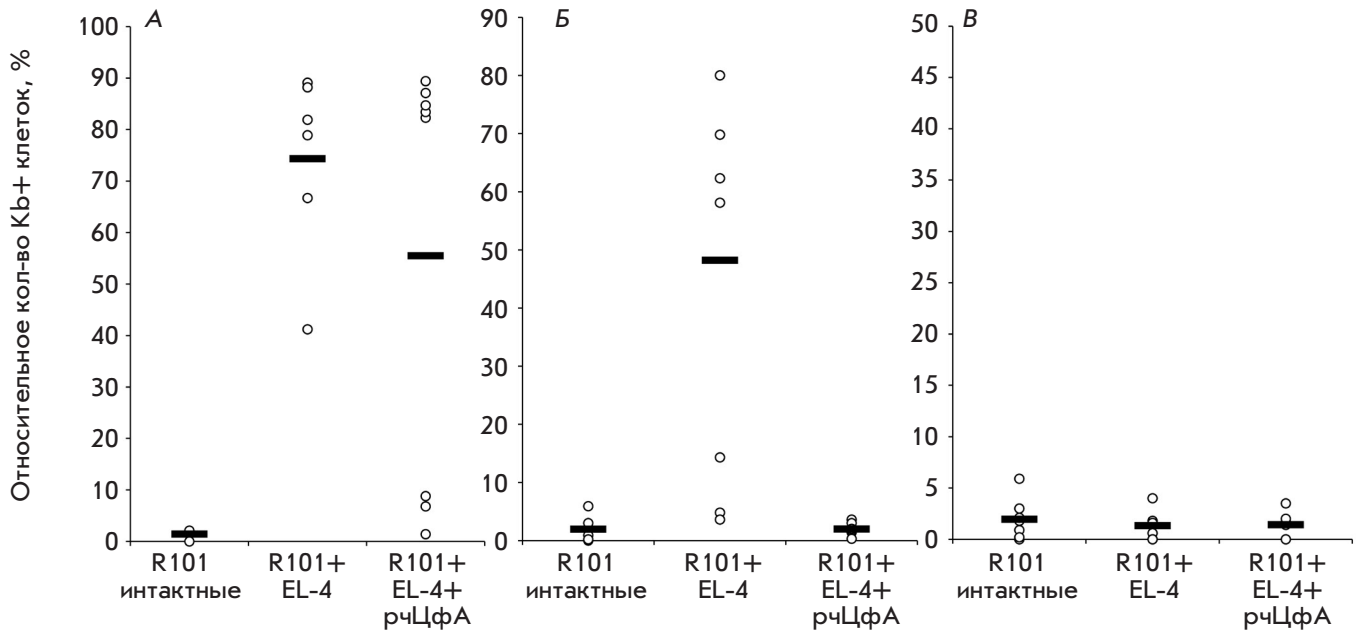


Рис. 1. Относительное количество клеток лимфомы EL-4 (K^{b+} , %) в брюшной полости мышей линии B10.D2(R101) на 6 (A), 9 (Б) и 12 (B) день после иммунизации. Представлены результаты 3 репрезентативных экспериментов ($M \pm SD$, $n = 6 - 8$). Относительное количество K^{b+} клеток в лаваже intactных мышей отображает уровень неспецифического связывания моноклональных анти- K^b -антител

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследовании использовали аллогенную систему, в которой отторжение клеток лимфомы EL-4 (K^bD^b) в организме мышей линии B10.D2(R101) ($K^dI-A^dI-E^dD^b$) происходило в силу различий по одной молекуле МНС класса I – H-2K^b. Показано, что введение рсЦфА приводит к полной элиминации EL-4 на 9 день после трансплантации опухолевых клеток, тогда как в норме отторжение лимфомы наблюдается к 12 дню (рис. 1).

Развитие иммунного ответа на лимфому EL-4 сопровождалось привлечением гранулоцитов в сайт локализации клеток-мишеней. К 6 дню после иммунизации рсЦфА индуцировал интенсивное накопление зрелых нейтрофилов в брюшной полости иммунизированных мышей, увеличивая относительное количество данных клеток в 3 раза по сравнению с контрольными иммунизированными животными (рис. 2A). К 9 дню после иммунизации под действием рсЦфА происходило увеличение незрелых гранулоцитов, а также промиелоцитов и миелоцитов в 2.5 и 4.5 раза соответственно по сравнению с контрольными иммунизированными животными (рис. 2B).

На следующем этапе проведена оценка влияния рсЦфА на количественные и субпопуляционные изменения $CD8^+$ Т-лимфоцитов у мышей-опухоленосителей. Нам не удалось обнаружить влияния рсЦфА

на динамику накопления $CD8^+$ Т-лимфоцитов в локальном очаге опухоли (при оценке лаважа) или на системном уровне (при оценке спленоцитов, данные не приведены). Однако анализ субпопуляций наивных клеток ($CD62L^+CD44^-$), центральных клеток памяти ($CD62L^+CD44^+$) и эффекторных клеток ($CD62L^-CD44^+$) в пуле $CD8^+$ Т-лимфоцитов селезенки показал, что под влиянием рсЦфА значительно увеличивается (на 65% относительно контрольных животных) количество эффекторных цитотоксических Т-клеток на 9 день после введения опухоли (данные не представлены, рис. 3), что коррелирует с динамикой элиминации клеток лимфомы (рис. 1).

Таким образом, показано, что рсЦфА при внутрибрюшинном введении стимулирует противоопухолевый иммунный ответ за счет раннего привлечения гранулоцитов в сайт локализации клеток-мишеней и ускоренного накопления эффекторных Т-киллерных клеток на системном уровне.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что у трансгенных мышей линии 1D1b в ходе иммунного ответа на клетки EL-4 формируется значительно меньший пул эффекторных $CD8^+$ Т-лимфоцитов по сравнению с мышами дикого типа, вследствие чего они не способны отторгать данную опухоль [5, 7].

В настоящей работе у мышей 1D1b оценено влияние рсЦфА на относительное количество эффектор-

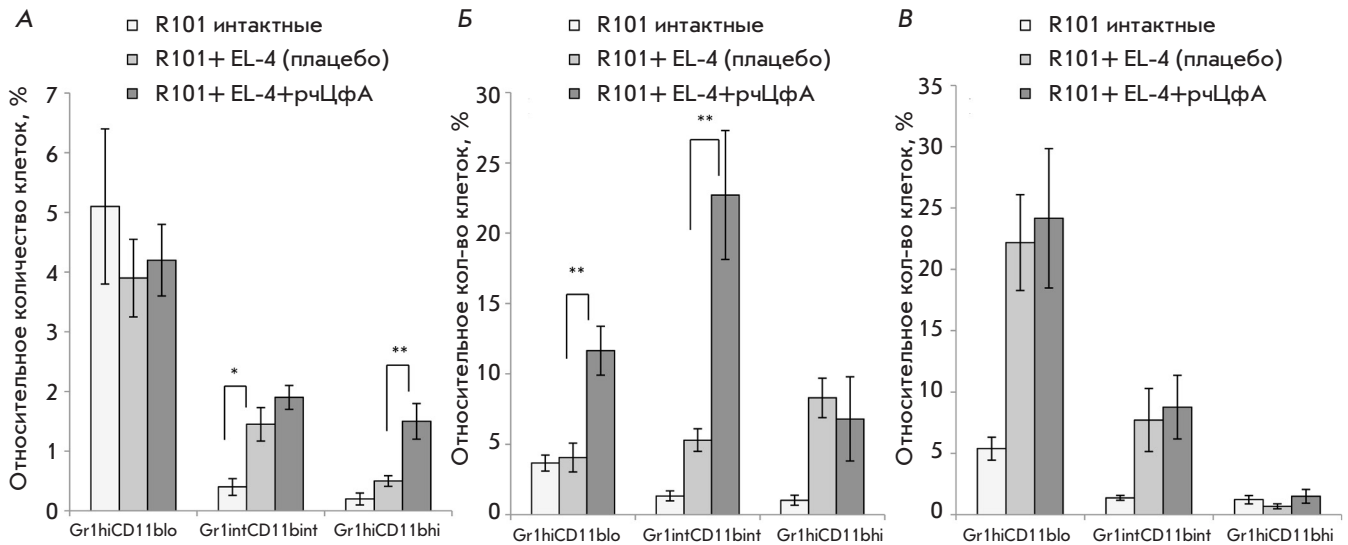


Рис. 2. Динамика изменения относительного количества незрелых нейтрофилов (Gr1hi CD11blo), промиелоцитов и миелоцитов (Gr1int CD11bint), зрелых гранулоцитов (Gr1hi CD11bhi) в брюшной полости мышей линии B10.D2(R101) на 6 (A), 9 (B) и 12 (V) день после иммунизации клетками лимфомы EL-4. Представлены данные 3 репрезентативных экспериментов ($M \pm SD$, $n = 6 - 8$). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$

ных Т-лимфоцитов, несущих на своей поверхности эндогенные или трансгенную β -цепь ТКР, которую идентифицировали с помощью коммерческих антител к V β 6.

Показали, что рчЦфА не влиял на относительное количество эффекторных Т-лимфоцитов, экспрессирующих эндогенные β -цепи ТКР, у мышей 1D1b, иммунизированных лимфомой EL-4 (рис. 4), но способствовал значительному (в 2 раза относительно контрольных животных) увеличению пула эффекторных Т-лимфоцитов, несущих трансгенную β -цепь ТКР (рис. 4).

Полученные данные позволяют предполагать, что рчЦфА способен модулировать противоопухолевый иммунный ответ как у мышей с нормальным репертуаром Т-лимфоцитов (B10.D2(R101)), так и в условиях ограниченного репертуара ТКР Т-лимфоцитов у трансгенных мышей линии 1D1b путем увеличения пула эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы изучали роль рчЦфА в развитии противоопухолевого иммунного ответа на лимфому EL-4 у мышей линии B10.D2(R101) и показали, что этот белок стимулирует накопление гранулоцитов в сайте локализации опухолевых клеток и системное увеличение пула эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов, приводящее к ускоренной элиминации клеток опухоли. Известно, что инфильтрация тканей нейтрофилами является первой фазой иммунного ответа при инфицировании или воспалении. Эти клетки способны захватывать антиген и мигрировать в дренирующие лимфоузлы и селезенку, где они взаимодействуют с антигенпредставляющи-

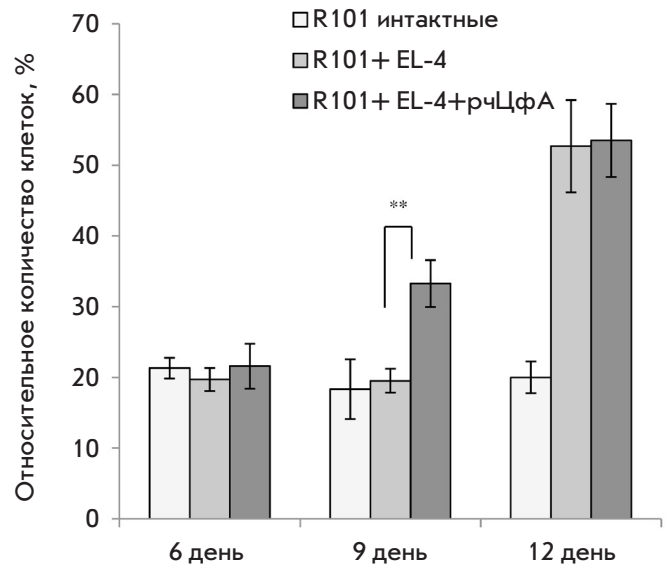


Рис. 3. Динамика накопления эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов (CD62L-CD44⁺) в селезенке мышей линии B10.D2(R101) после иммунизации клетками EL-4. Представлены результаты 3 репрезентативных экспериментов ($M \pm SD$, $n = 6 - 8$). ** $p \leq 0.01$

мигрантами. Эти клетки способны захватывать антиген и мигрировать в дренирующие лимфоузлы и селезенку, где они взаимодействуют с антигенпредставляющи-

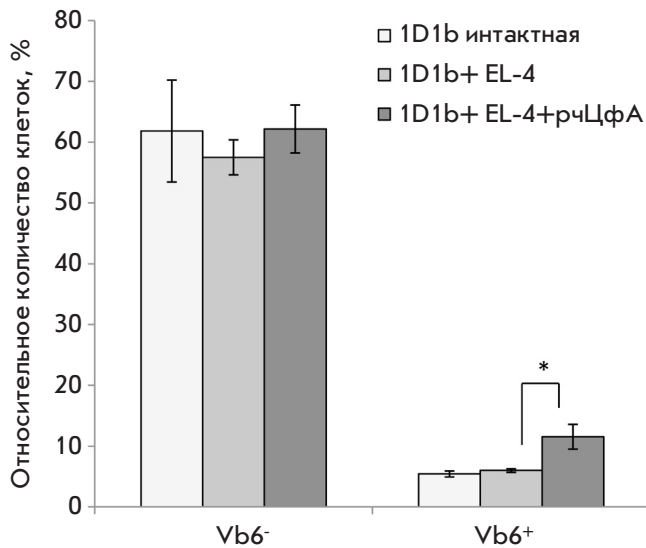


Рис. 4. Относительное количество (%) эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов (CD62L⁻CD4⁺) с эндогенными β-цепями ТКР (Vb6⁻) или трансгенной β-цепью (Vb6⁺) ТКР в селезенке мышей трансгенной линии 1D1b на 12 день после иммунизации. Представлены результаты 3 репрезентативных экспериментов (M ± SD, n = 7). *p ≤ 0.05

ми клетками (АПК) и лимфоцитами [8] или сами выступают в роли АПК [9], участвуя в формировании адаптивного иммунного ответа. Ранее мы показали, что нейтрофилы участвуют в развитии иммунного ответа на клетки аллогенной опухоли [10]. Роль дан-

ных клеток может заключаться в обеспечении костимуляторных сигналов (CD80 и CD86) и цитокинового окружения (интерлейкин 12), необходимых для дифференцировки цитотоксических Т-лимфоцитов [10, 11]. Показано, что процессы, происходящие в брюшной полости при внутрибрюшинном введении рчЦФА, коррелируют с иммунным ответом на уровне организма.

У мышей 1D1b экспрессия трансгенной β-цепи ТКР приводит не только к сокращению репертуара ТКР, но и снижает количество активированных Т-лимфоцитов [5]. Иммунный ответ мышей 1D1b на лимфому EL-4 недостаточен для полного отторжения опухоли, он приводит к иммуноредактированию лимфомы посредством селекции наименее иммуногенных клонов, которые через 60 дней убивают животных [7]. В данной экспериментальной системе установлено, что под действием рчЦФА происходит статистически значимое увеличение пула специфических цитотоксических Т-лимфоцитов на начальных этапах иммунного ответа на лимфому EL-4. Полученные данные позволяют предполагать, что рчЦФА способен модулировать противоопухолевый иммунный ответ как у мышей с нормальным репертуаром Т-лимфоцитов, так и в условиях ограниченного репертуара Т-клеток путем увеличения пула эффекторных Т-киллеров.

Таким образом, нами показано, что рчЦФА обладает иммуностимулирующим действием, способствуя ускоренному развитию противоопухолевого иммунного ответа за счет стимуляции врожденного и адаптивного звеньев иммунитета. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nigro P, Pompilio G, Capogrossi M.C. // Cell Death Disease. 2013. V. 4. P. e888. doi: 10.1038/cddis.2013.410.
- Khromykh L.M., Kulikova N.L., Anfalova T.V., Muranova T.A., Abramov V.M., Vasiliev A.M., Khlebnikov V.S., Kazansky D.B. // Cell Immunol. 2007. V. 249. № 1. P. 46–53.
- Dawar F.U., Xiong Y., Khattak M.N.K., Li J., Lin L., Mei J. // J. Leukoc. Biol. 2017. V. 102. № 4. P. 989–992.
- Bharadwaj U., Zhang R., Yang H., Doan D., Li M., Chen C., Yao Q. // J. Surgical Res. 2004. V. 121. № 2. P. 294.
- Силаева Ю.Ю., Калинина А.А., Вагида М.С., Хромых Л.М., Дейкин А.В., Ермолкевич Т.Г., Садчикова Е.Р., Гольдман И.Л., Казанский Д.Б. // Биохимия. 2013. Т. 78. № 5. P. 614–626.
- Хромых Л.М., Калинина А.А., Козырь А.В., Колесников А.В., Силаева Ю.Ю., Казанский Д.Б. Патент № 2603283. Российская Федерация. 2015.
- Silaeva Yu.Yu., Grinenko T.S., Vagida M.S., Kalinina A.A., Khromykh L.M., Kazansky D.B. // J. Immunotoxicol. 2014. V. 1. № 4. P. 393–399.
- Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. // Nat. Rev. Immunol. 2011. V. 11. № 8. P. 519–523.
- Takashima A., Yao Y. // J. Leukoc. Biol. 2015. V. 98. № 4. P. 489–496.
- Марюхнич Е.В., Звездова Е.С., Анфалова Т.В., Хромых Л.М., Казанский Д.Б. // Докл. Акад. наук. 2007. Т. 414. № 1. P. 126–129.
- Побезинский Л.А., Побезинская Е.Л., Звездова Е.С., Петрицев В.Н., Гриненко Т.С., Батурина И.А., Анфалова Т.В., Хромых Л.М., Васильева Т.В., Казанский Д.Б. // Докл. Акад. наук. 2005. Т. 402. № 3. P. 421–426.