

УДК 577.29.571.27.576.53

**БЕЛОК ВРОЖДЁННОГО ИММУНИТЕТА Tag7
ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ С ЛИМФОЦИТАМИ СТИМУЛИРУЕТ
ПОЯВЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ НК-КЛЕТОК**

**Т. Н. Шарاپова*, Е. А. Романова, Л. П. Сашенко,
член-корреспондент РАН Н. В. Гнучев, Д. В. Яшин**

Поступило 10.09.2018 г.

Tag7 (PGRP-S) — белок врождённого иммунитета, который принимает участие в антибактериальной и противоопухолевой защите, а также стимулирует созревание цитотоксических субпопуляций лимфоцитов. Обнаружили, что инкубация в течение 3 сут лимфоцитов с Tag7 способствует появлению цитотоксических НК-клеток, активных против ряда опухолевых клеточных линий.

Ключевые слова: лимфоциты, цитокины, НК-клетки.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524846777-780>

Естественные клетки-киллеры (НК-клетки) — клетки врождённого иммунитета, способные элиминировать клетки с изменённой антигенной детерминантой главного комплекса гистосовместимости (МНС), в частности опухолевые клетки и клетки, инфицированные вирусом [1, 2]. Изменение структуры МНС может происходить вследствие инфекции, опухолевой трансформации или влияния иных факторов [1].

На поверхности НК-клеток экспрессируется широкий спектр активирующих и ингибирующих рецепторов, которые взаимодействуют с клеткой-мишенью. В зависимости от баланса сигналов, поступающих от рецепторов, определяется программа действия НК-клеток: если преобладает сигнал от активирующего рецептора, то запускается программа лизиса клетки-мишени [3].

На своей поверхности НК-клетки экспрессируют несколько видов ингибирующих рецепторов. В норме они распознают антигены МНС класса I (присутствуют на поверхности всех клеток организма) [4, 5].

Цитотоксическая функция НК-клеток прежде всего связана с активирующими рецепторами, которые способны распознавать специфические лиганды на поверхности вирусинфицированных или трансформированных клеток. Наиболее изученный активирующий рецептор — NKG2D, который распознаёт неклассический антиген МНС — MicA. В результате трансформации или проникновения

вируса в клетке может происходить экспрессия стрессовых молекул, таких как MicA, MicB, ULBP1–6 (неканонические антигены МНС), Hsp70, и снижаться экспрессия собственного комплекса МНС I. В этом случае сигнал от активирующего рецептора, например NKG2D, будет преобладать над тем, который идёт от связывания ингибирующего рецептора с МНС, и мишень будет ликвидирована НК-клеткой. Уменьшение экспрессии антигенов МНС класса I позволяет клетке избежать контакта с лимфоцитами CD8⁺, но не избавляет от взаимодействия с НК-клетками [6–8].

Белок Tag7 — консервативный белок врождённого иммунитета, представлен у насекомых, моллюсков и позвоночных. Достоверно изучена его роль в антибактериальной защите у насекомых. В ИБГ РАН, где он впервые был обнаружен, изучали роль Tag7 в противоопухолевом иммунитете [9]. Было показано [10], что Tag7 образует с Hsp70 комплекс, обладающий цитотоксическим действием на клетки широкого спектра опухолевых клеточных линий. Молекула Tag7 способна активировать цитотоксические субпопуляции лимфоцитов при инкубации в течение 6 сут с мононуклеарными клетками периферической крови (РВМС) здоровых доноров [11].

Цель работы — определить влияние Tag7 на реализацию цитотоксической функции НК-клеток против опухолевых клеток.

Использовали РВМС, выделенные из лейкоцитарной массы здоровых доноров последовательным центрифугированием в градиенте концентрации Ficoll-Paque PLUS (“GE Healthcare”, Швеция) [12]. Процедура получения и очистки Tag7 описана нами

*Институт биологии гена
Российской Академии наук, Москва
E-mail: sharapovatat.nik@gmail.com

ранее [10]. Конечная концентрация белка в РВМС не превышала 10^{-9} М, НК-клетки активировали рекомбинантным IL-2 (“Sigma-Aldrich”, США, 1000 ед./мл). В качестве клеток-мишеней мы использовали клетки фибробластомы человека линии K562. Лимфоциты и клетки-мишени в отношении 20 : 1 инкубировали в среде RPMI 1640 (Gibco®, “ThermoFisher Scientific”, США), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (“Invitrogen”, США), в 5% CO₂ и при температуре 37 °С. Для измерения цитотоксической активности в течение 3 ч в среде без сыворотки использовали метод определения жизнеспособных клеток CytoTox-ONE™ (“Promega”, США). Для блокирования цитотоксической активности использовали антитела против гранзима В (“Santa Cruz”, США), которые добавляли к опухолевым клеткам за час до инкубации с лимфоцитами. Для оценки уровня экспрессии цитокинов использовали набор для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) компании “Invitrogen” (США). Выделение чистых субпопуляций лимфоцитов проводили с помощью магнитной сепарации частицами Dynabeads (“Invitrogen”) согласно протоколу производителя. Результаты проточной цитометрии получали с помощью прибора Cytomics FC500 MPL с использованием конъюгированных антител CD16-FITC, CD56-PE (“Beckman Coulter”, США).

Через 3 сут инкубации Tag7 с РВМС мы не обнаружили субпопуляцию цитотоксических лимфоцитов, способную убивать клетки K562 (рис. 1). Секреция перфоринов и гранзимов — один из самых распространённых способов убийства опухолевых клеток, характерный для НК-клеток и Т-киллеров CD8⁺. Специфические антитела против гранзима В

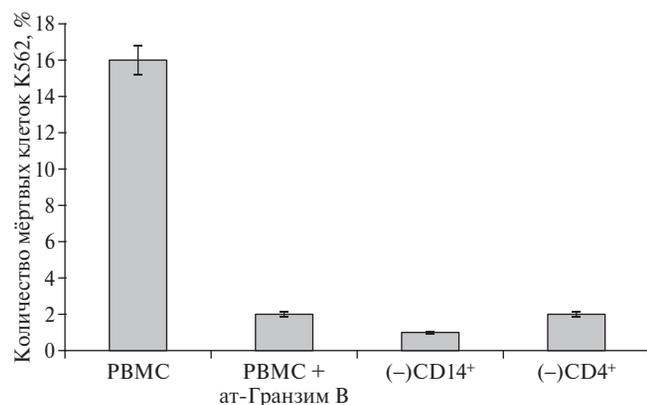


Рис. 1. Цитотоксическая активность РВМС, активированных Tag7, через 3 сут после 3 ч инкубации с клетками K562 с применением антител против гранзима В и в отсутствие (-) субпопуляции моноцитов CD14⁺ и Т-хелперов CD4⁺. Здесь и на рис. 2–4 $M \pm m$, $n = 4$ для каждой группы.

практически полностью блокировали цитотоксическую активность (рис. 1). Логично предположить, что после инкубации Tag7 с РВМС через 3 сут должны появиться в инкубационной среде НК-клетки или Т-киллеры. Наши предварительные исследования показали, что активированные Tag7 Т-лимфоциты убивают опухолевые клетки без использования гранзимов [11]. Поэтому мы предположили, что вся цитотоксическая активность через 3 сут реализуется НК-клетками. С помощью метода проточной цитометрии мы подтвердили это предположение: количество НК-клеток достигло максимума через 3 дня после добавления Tag7 (рис. 2).

Далее мы предположили, что для активации цитотоксической функции НК-клеток необходимо участие моноцитов. Ранее мы показали [11], что на поверхности моноцитов экспрессирован рецептор TREM-1, с которым связывается Tag7. Используя метод магнитной сепарации, мы выделили пул моноцитов из инкубационной среды и активировали оставшиеся лимфоциты Tag7. После этой процедуры мы не зарегистрировали проявления цитотоксической активности (рис. 1), следовательно, моноциты участвуют в реализации цитотоксической функции НК-клеток.

Известно, что для активации НК-клеток не требуется презентация антигена, поэтому мы предположили, что ключевая роль в развитии их цитотоксичности принадлежит цитокинам. Одним из ключевых факторов созревания НК-клеток является определённый спектр цитокинов, главный из которых — IL-2 [13]. Для проверки этой гипотезы с помощью ИФА мы измерили уровень секреции цитокина IL-2 в течение 3 сут после добавления Tag7 и обнаружили, что его количество выросло через 3 сут (рис. 3). Основным источником IL-2 являются Т-хелперы или лимфоциты CD4⁺, которые выделяют его как фактор созревания цитотоксических Т-клеток, а также для ауторегуляции собственных

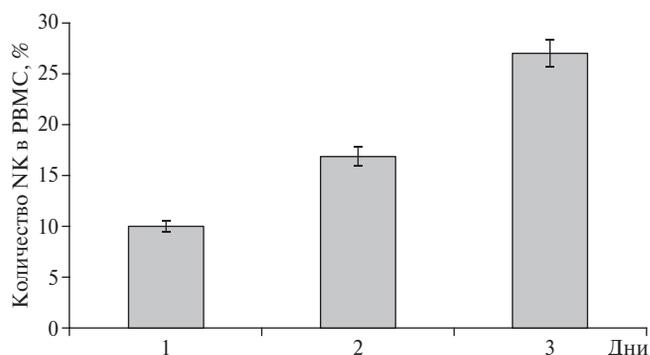


Рис. 2. Динамика содержания субпопуляции НК-клеток в течение 3 сут в РВМС, активированных Tag7.

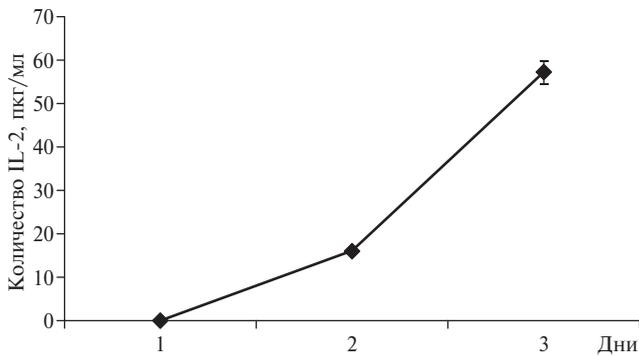


Рис. 3. Уровень секреции IL-2 в течение 3 сут после добавления Tag7.

функций. Чтобы установить участие лимфоцитов CD4⁺ в созревании NK-клеток и реализации их цитотоксической функции, с помощью магнитной сепарации мы удалили популяцию лимфоцитов CD4⁺ из инкубационной среды и активировали оставшиеся лимфоциты белком Tag7. После этих манипуляций мы не наблюдали никакой цитотоксической активности (рис. 1). По-видимому, моноциты принимают участие в инициации процессов выработки цитокинов и играют роль посредника в активации лимфоцитов CD4⁺.

Чтобы достоверно определить роль IL-2 в развитии цитотоксичности NK-клеток, эти клетки выделяли методом магнитной сепарации, инкубировали в течение 3 сут с рекомбинантным IL-2 и оценивали способность индуцировать гибель клеток-мишеней (рис. 4). Цитотоксическая активность активированных IL-2 NK-клеток достигла 75% от классической активности РВМС через 3 сут, и в отсутствие активатора мы её не зафиксировали.

Таким образом, мы смогли определить ключевые моменты активации цитотоксической функции NK-клеток. При добавлении Tag7 к РВМС происходит активация моноцитов и, как следствие, лимфоцитов CD4⁺, которые начинают секретировать IL-2, который стал ключевым цитокином, участвующим в реализации цитотоксической функции NK-клеток. Уровень цитокина вырос уже через 2 сут и достиг максимума через 3 сут. Увеличение секреции IL-2 коррелировало с ростом процентного содержания NK-клеток в РВМС в течение 3 дней. Наличие цитокинов в среде, по-видимому, стимулировало созревание цитотоксических NK-клеток. Активированные Tag7 лимфоциты через 3 сут были

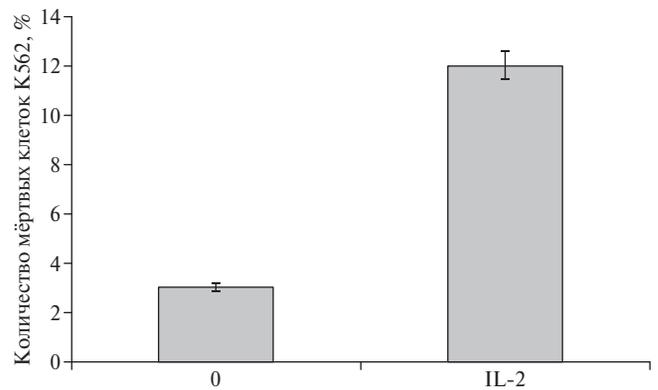


Рис. 4. Цитотоксическая активность NK-клеток в присутствии IL-2.

способны индуцировать клеточную смерть в опухолевых клетках. Таким образом, мы подтвердили участие Tag7 в созревании цитотоксических субпопуляций NK-клеток.

Источник финансирования. Работа была поддержана грантом РФФ 15–14–00031–П.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Früh K., Gruhler A., Krishna R.M., et al. // Immunol. Rev. 1999. V. 168. P. 157–166.
2. Sun J.C., Lanier L.L. // Nature Revs. Immunol. 2011. V. 11. № 10. P. 645–657.
3. Martinet L., Smyth M.J. // Nature Revs. Immunol. 2015. V. 15. № 4. P. 243–254.
4. Arnon T.I., Markel G., Mandelboim O. // Seminars in Cancer Biol. 2006. V. 16. № 5. P. 348–358.
5. Gunturi A., Berg R.E., Forman J. // Immunol. Res. 2004. V. 30. № 1. P. 29–34.
6. González S., López-Soto A., Suarez-Alvarez B., et al. // Trends Immunol. 2008. V. 29. № 8. P. 397–403.
7. Gehrman M., Liebisch G., Schmitz G., et al. // PLoS One. 2008. V. 3. № 4. P. e1925.
8. Diefenbach A., Raulet D.H. // Immunol. Revs. 2001. V. 181. № 1. P. 170–184.
9. Кустикова О.С., Киселев С.Л., Бородулина О.П. и др. // Генетика. 1996. Т. 32. № 5. С. 621–628
10. Sashchenko L.P., Dukhanina E.A., Yashin D.V., et al. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 3. P. 2117–2124.
11. Sharapova T.N., Ivanova O.K., Soshnikova N.V., et al. // J. Innate Immunol. 2017. V. 9. P. 598–608.
12. Sashchenko L.P., Gnuchev N.V., Lukjanova T.I., et al. // Immunol. Lett. 1993. V. 37. № 2–3. P. 153–157.
13. Gasteiger G., Hemmers S., Firth M.A., et al. // J. Exp. Med. 2013. V. 210. № 6. P. 1167–1178.

**INNATE IMMUNE PROTEIN Tag7 STIMULATES
THE APPEARANCE OF CYTOTOXIC NK CELLS AFTER INCUBATION
WITH LYMPHOCYTES**

**T. N. Sharapova, E. A. Romanova, L. P. Sashchenko,
Corresponding Member of the RAS N. V. Gnuchev, D. V. Yashin**

Received September 10, 2018

Tag7 (PGRP-S) is an innate immune protein that is involved in the antibacterial and antitumor defense and stimulates the maturation of cytotoxic lymphocyte subpopulations. It was found that the incubation of lymphocytes with Tag7 for 3 days promotes the appearance of cytotoxic NK cells that are active against a number of tumor cell lines.

Keywords: lymphocytes, cytokines, NK cells.