

УДК 577.21

ИНКУБАЦИЯ ЛИМФОЦИТОВ С IL-2 ВЫЗЫВАЕТ ПОЯВЛЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ Т КЛЕТОК, НЕСУЩИХ FASL, CD25 И LFA-1 НА ПОВЕРХНОСТИ

© 2023 г. О. К. Иванова^{1,*}, Т. Н. Шарапова¹, Е. А. Романова¹, Д. В. Яшин¹, Л. П. Сащенко¹

Представлено академиком РАН А.Г. Габировым

Поступило 29.11.2022 г.

После доработки 14.12.2022 г.

Принято к публикации 14.12.2022 г.

Для осуществления противоопухолевой активности против клеток, потерявших поверхностные антигены, лимфоциты человека должны обладать определенным репертуаром поверхностных белков, способных связаться с опухолевой клеткой и индуцировать в ней программируемую клеточную смерть. В этой работе мы показали, что активация цитокином IL-2 клеток здоровых доноров в течение 6 сут вызывает появление на CD8⁺CD25⁺ субпопуляции Т лимфоцитов белков FasL, CD25 и LFA-1, а также переводит белок LFA-1 в активную форму, имеющую высокое сродство к своей мишени, интегрина ICAM-1. Появление этих белков на поверхности данной субпопуляции лимфоцитов позволяет им индуцировать программируемую клеточную смерть в HLA-отрицательных опухолевых клетках.

Ключевые слова: Tag7, интегрины, FasL, IL-2, опухолевые клетки

DOI: 10.31857/S2686738923700208, **EDN:** QICODU

Известно, что цитотоксические лимфоциты играют ключевую роль в противоопухолевой защите. Важным, актуальным направлением является поиск белков – регуляторов, индуцирующих цитотоксическую активность лимфоцитов, характеристика этапов активации этих лимфоцитов, описание механизмов гибели опухолевых клеток под действием этих белков [1, 2]. Понимание этих процессов позволит наметить подходы к направленной регуляции процессов гибели опухолевых клеток.

Недавно нами было показано, что лиганды рецептора врожденного иммунитета TREM-1, белок Tag7, не только усиливает воспалительные процессы, но и активирует генерацию CD8⁺ Т-лимфоцитов, убивающих МНС-негативные опухолевые клетки [3]. По спектру клеток-мишеней, фенотипу и механизмам клеточной гибели индуцированные лигандами TREM-1 лимфоциты были идентичны ЛАК клеткам [4]. Исследование этапов активации цитотоксических лимфоцитов под действием Tag7 позволило установить, что

секреция IL-2 является ключевым моментом при генерации этих лимфоцитов [3].

Для детального анализа молекулярных механизмов TREM-1 зависимой активации цитотоксических лимфоцитов существенно важно представлять изменения под действием IL-2 активности мембранных белков CD8⁺ Т-лимфоцитов, обуславливающих их цитотоксическое действие.

Ранее мы показали, что FasL, присутствующий на поверхности TREM-1 – индуцированных лимфоцитов, необходим для индукции цитотоксического сигнала в опухолевые клетки [5]. Мы также установили, что рецептор NKG2D на поверхности CD8⁺ Т-лимфоцита взаимодействует с неканонической молекулой МНС, белком MicA, присутствующим на внешней мембране опухолевой клетки, и обеспечивает узнавание лимфоцитом своей клетки-мишени. [6] Взаимодействие NKG2D с MicA высоко специфично, но стабильность межклеточного комплекса, образованного за счет NKG2D-MicA связи, достаточно низкая. Для стабилизации такого комплекса необходимо образование иммуносинапса, в создании которого участвуют молекулы адгезии [7–9]. Молекулы адгезии обеспечивают межклеточные связи и их роль в образовании клеточных комплексов чрезвычайно высока. Наиболее хорошо изучены белки семейства интегринов LFA1 и ICAM1 [10]. Также есть указания на то, что белки гликопротеиды

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: olga.k.ivanova@gmail.com

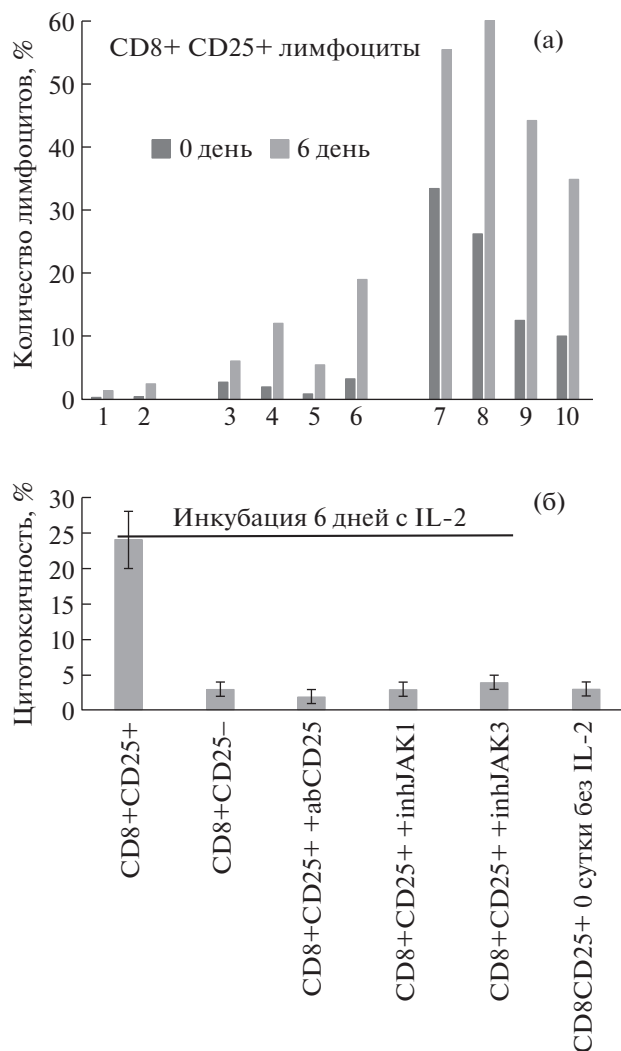


Рис. 1. (а) Инкубация PBMC с IL2 вызывает увеличение количества CD8+CD25+ Т-лимфоцитов. Представлены эксперименты на материале от 10 доноров. (б) Цитотоксическая активность CD8+ субпопуляций Т клеток в присутствии ингибиторов и антител.

семейства иммуноглобулинов могут играть важную роль для адгезии лимфоцитарных клеток [11]. Для проявления лимфоцитами цитотоксического действия участие интегринов в создании имуносинапса также необходимо, как и участие белков, непосредственно индуцирующих цитотоксические процессы в этих клетках.

Целью этой работы было исследование влияния инкубации с IL-2 на состав поверхностных белков фракции лимфоцитов, осуществляющей противоопухолевую цитотоксическую активность.

Лимфоциты получали из лейкомассы здоровых доноров путем центрифугирования на градиенте фикола по стандартной методике. Все доноры подписывали добровольное согласие, материал был принят в работу анонимно. Выделение CD8+, CD8+CD25+ и CD8+CD25- субпопуля-

ций лимфоцитов проводили с использованием наборов с магнитными шариками Dynabeads (Invitrogen, США). Для активации цитотоксических лимфоцитов общую лейкоцитарную фракцию инкубировали в стандартных условиях с добавлением IL2 (ThermoFisher Scientific, США) в концентрации 1000 ед/мл в течение 6 сут. Клетки K562 (эритробластома человека) культивировали в среде RPMI (ПанЭко, РА) с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, США). Культура была получена из банка клеточных линий РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Для измерения цитотоксичности лимфоциты добавляли к культуре K562 в соотношении 20 : 1 и инкубировали 20 ч. Цитотоксичность измеряли с помощью набора Cytotox (Promega, США) по методике производителя.

Таблица 1. Экспрессия мРНК белков CD25, FasL, NKG2D, LFA1 возрастает в результате инкубации CD8⁺ Т-лимфоцитов с IL2

	CD25*	FasL*	NKG2D	LFA1*
0 день	1	1	1	1
6 день	13.22 ± 2.53	35.88 ± 2.87	1.292 ± 0.12	1.42 ± 0.07

* $p < 0.005$

Для проточной цитофлуориметрии были использованы следующие антитела: антитела к CD3 (Tri-Color), CD8 (APC), CD25 (PE/Cy7), CD56 (PerCP/Cy5.5), производства Biolegend, США, антитела к FasL, NKG2D (FITC), ICAM1 производства Santa Cruz Biotechnology, США, антитела к MICA, Fas производства Sony, США, вторичные антитела против Fc-фрагмента антител, полученных в кролике, меченые Alexa Fluor 546 а также полученных в мыши, меченые Alexa Fluor 488, производства Life Technologies, США. Для исследования изменений структуры LFA1 для детекции “закрытой” конформации использовали антитело клон HI111 (меченое Alexa Fluor 488), а для “открытой”, активной конформации — m24 (производства Biolegend, США). Фенотип клеток определяли на проточном цитофлуориметре Cytotoflex (Beckman Coulter Life Sciences, США).

В экспериментах по ингибированию цитотоксичности использовали блокирующие антитела к CD25 в концентрации 10 мкг/мл (клон B-B10, BMS134, Invitrogen, США), ингибиторы JAK (JAK inhibitor I sc-204021, JAK3 inhibitor VI, ChemCruz, США).

Для осуществления ПЦР в реальном времени РНК образцов изолировали в Trizol Reagent (Invitrogen, США). Синтез кДНК проводили с использованием Oligo(dT) праймеров (Евроген, РФ). Полученные продукты были использованы для qPCR с праймерами к генам RPLP0, GAPDH, FasL, NKG2D, LFA1. Уровень мРНК RPLP0 и GAPDH использовали в качестве контроля. Использованные праймеры: FasL forward: 5' GGATGTTTCAGCTCTTCCACC 3', reverse: 5' AGTTG-GACTTGCCTGTAAATGG 3'; NKG2D forward: 5' AATTCCCTTGACCGAAAGTTACTG 3', reverse: 5' AGTAAATCCTGGTCTCTTTGCT 3'; GAPDH forward: CAACAGCGACACCCACTCCT, reverse CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA; RPLP forward: 5'-ACTGGAGACAAAGTGGGAGCC, reverse: 5'-CAGACACTGGCAACATTGCG; LFA1: forward: 5' TGCTTACAATAAACTCTCCTCCAG 3', reverse: 5' TCGTAGGTGACTTTTCAGGGT 3'. Измерения в каждой точке проводили не менее чем в трех повторностях и рассчитывали среднее значение.

Уровни экспрессии определяли количественно с использованием метода 2 $\Delta\Delta$ Ct.

На рисунках (если не указано иначе) представлены данные не менее трех независимых экспериментов как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Различия между обработкой и контролем проверяли на значимость с помощью программного обеспечения SigmaPlot (Systat Software Inc, Великобритания). SigmaPlot (Systat Software Inc, Berkshire, Великобритания), используя односторонний ANOVA.

Сначала мы исследовали влияние IL-2 на изменение активности субпопуляций CD8⁺ Т-лимфоцитов. Были проанализированы РВМС десяти доноров и во всех случаях был детектирован значительный рост субпопуляции CD8⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов. (рис. 1а). С помощью магнитной сепарации были изолированы субпопуляции CD8⁺CD25⁺ — и CD8⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов и определялась их способность индуцировать цитолиз МНС-негативных опухолевых клеток. Можно видеть, что цитотоксической активностью обладает только фракция CD8⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов (рис. 1б).

Ранее мы также установили, что присутствие на внешней мембране лимфоцитов α -субъединицы рецептора IL-2 (антиген CD25) существенно важно для цитотоксической активности этих лимфоцитов. Инкубация РВМС с белком Tag7 в присутствии антител к CD25 антигену или удаление из РВМС с помощью магнитной сепарации и специфических антител CD25⁺ Т-лимфоцитов приводило к исчезновению цитотоксической активности [4]. Мы объясняли эти результаты блокированием взаимодействия IL-2 с его рецептором и препятствием к созреванию цитотоксических CD8⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов под действием этого цитокина. Здесь мы исследовали влияние антиCD25 антител на способность уже созревших цитотоксических CD8⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов индуцировать цитотоксические процессы в опухолевых клетках.

CD8⁺CD25⁺ Т-лимфоциты проинкубировали с антителами и добавляли к K562 клеткам, через 20 ч коинкубации подсчитывали число погибших опухолевых клеток. Можно видеть, что анти-CD25 антитела полностью блокируют цитотоксическую активность (рис. 1б). Интересно, что добавление ингибиторов фосфокиназ JAK1 и JAK3 — адапторов, передающих CD25-индуцируемый внутриклеточный сигнал путем включения протеинкиназного каскада, также блокировало цитотоксическую активность. Таким образом, α -субъединица рецептора IL-2 участвует в проведении внутриклеточного сигнала, необходимого для активации цитотоксического действия.

Однако наличие CD25- антигена на поверхности CD8⁺ Т-лимфоцита — условие необходимое,

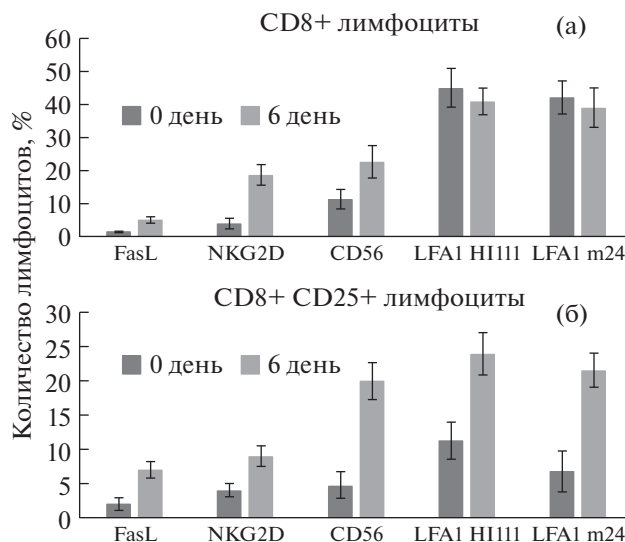


Рис. 2. IL2 вызывает изменение фенотипа субпопуляций CD8⁺ (а) и CD8⁺CD25⁺ (б) Т-лимфоцитов.

но недостаточное для индукции цитотоксических процессов. Сравнение цитотоксической активности CD8⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов, изолированных из РВМС здоровых доноров без предварительной инкубации с IL-2 и CD8⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов, полученных после 6-суточной инкубации с IL-2, свидетельствует о том, что, несмотря на наличие белка CD25 на поверхности тех и других лимфоцитов, инкубация с IL-2 необходима для цитотоксичности. Цитотоксической активностью обладают только CD8⁺CD25⁺ Т лимфоциты, прошедшие инкубацию с IL-2 (рис. 1б).

С целью выявления других белков, обуславливающих появление цитотоксичности, исследовали изменения под действием IL-2 репертуара белков на поверхности CD8⁺ и CD8⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов. Среди таких белков были: NKG2D, ответственный за связывание с MicA на поверхности опухолевой клетки и узнавание лимфоцитом клетки-мишени, FasL, ответственный за индукцию цитотоксического сигнала через FasL-Fas взаимодействие. Последнее время привлекают внимание молекулы адгезии, обеспечивающие межклеточные связи. Известно, что при взаимодействии цитотоксических лимфоцитов с клетками-мишенями молекулы адгезии участвуют в создании иммуносинапса [7]. Из достаточно широкого спектра молекул адгезии нами исследовалась роль интегрина LFA1 и его лиганда ICAM1, и гликопротеина из семейства иммуноглобулинов CD56.

Используя метод ПЦР в реальном времени, исследовалось изменение экспрессии генов интересующих нас антигенов в CD8⁺ Т-лимфоцитах, инкубированных в течение 6 сут с IL-2. Можно видеть, что экспрессия мРНК белков CD25, FasL

и LFA1 повышается в ответ на IL2 в субпопуляции CD8⁺CD25⁺ клеток (табл. 1). Далее с помощью специфических антител и проточной цитофлуориметрии исследовали локализацию этих белков на поверхности CD8⁺ и CD8⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов (рис. 2 а, б). Было установлено, что в процессе взаимодействия лимфоцита с клеткой-мишенью LFA1 изменяет конформацию, открывая высоко аффинный сайт связывания с ICAM1. Изменение конформации обеспечивает образование прочного иммуносинапса, необходимого для цитотоксического воздействия [12].

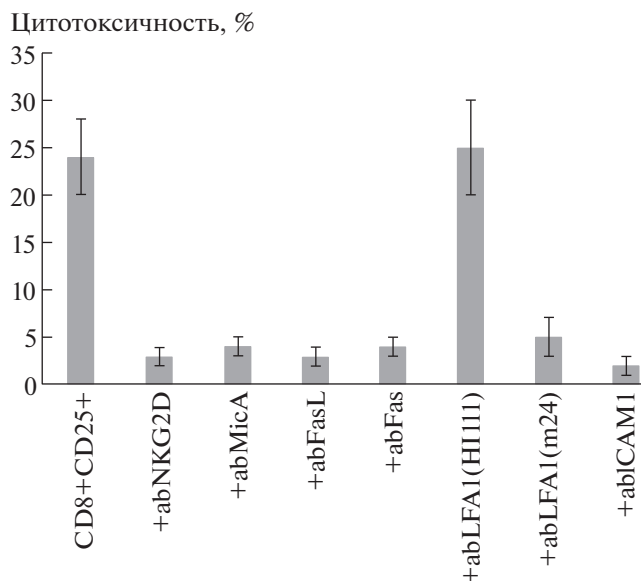


Рис. 3. Цитотоксическая активность CD8⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов в присутствии блокирующих антител.

В данной работе мы использовали антитела, детектирующие неактивную (HI111) и активную (m24) формы LFA1.

Можно видеть, что FasL, NKG2D и CD56 присутствуют на поверхности как CD8⁺, так и CD8⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов. После 6-суточной инкубации с IL-2 количество клеток, несущих на поверхности эти белки, увеличивается. Интегрин LFA1 присутствует на мембранах CD8⁺ и на CD8⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов как в активной, так и в неактивной формах. Инкубация с IL-2 не приводит к росту обеих форм LFA1 на поверхности CD8⁺ Т-лимфоцитов. Однако в присутствии этого цитокина детектируется увеличение количества CD8⁺CD25⁺ лимфоцитов, на мембране которых присутствуют как активная, так и неактивная формы LFA1 (рис. 2а, б).

Можно предположить, что образование иммуносинапса также, как и присутствие CD25, Fas и NKG2D, совершенно необходимо для осуществления цитотоксической активности.

Для подтверждения этого предположения исследовалось влияние антител к вышеупомянутым белкам на гибель опухолевых клеток под действием этих лимфоцитов. (рис. 3). Ранее мы показали [6], а здесь подтвердили, что антитела к NKG2D и его лиганду MicA, а также антитела к FasL и его рецептору Fas полностью блокируют цитотоксическое действие лимфоцитов. Также можно видеть, что цитотоксическая активность значительно снижается в присутствии антител к активной форме LFA1. Полностью блокируется цитотоксичность при добавлении лимфоцитов к опухолевым клеткам, предварительно инкубированных с антителами к ICAM1. Антитела к LFA1 в “закрытой”, неактивной конформации и к CD56 не оказывали никакого влияния на цитотоксичность лимфоцитов.

Суммируя вышесказанное, можно отметить, что ключевым отличием цитотоксически активной популяции CD8⁺CD25⁺ клеток, возникающей в РВМС после 6 дней инкубации с цитокином IL-2, является увеличение процента клеток, несущих необходимые для цитотоксического действия белки: NKG2D, FasL, CD56 а также активную форму LFA1. Это помогает клеткам данной субпопуляции узнавать опухолевую клетку, образовывать с ней прочный контакт, и индуцировать в ней программируемую клеточную смерть.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Геномное редактирование” Федерального государственного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук (ЦКП ИБГ РАН).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась при финансовой поддержке Российской Федерации в рамках договора “Молекулярно-клеточные механизмы онкологических, иммунных, метаболических заболеваний, моделирование и экспериментальное обоснование методов репрограммирования и онкотаргетинга” (Договор № 32009625772 от 02.11.20).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Phillips J.H., et al.* Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytotoxicity. // *J Exp Med.* 1986. PMID: 3489062
2. *Yannelli J.R.* The preparation of effector cells for use in the adoptive cellular immunotherapy of human cancer // *J Immunol Methods.* 1991. PMID: 2040807
3. *Sharapova T.N., Romanova E.A., Ivanova O.K., et al.* Cytokines TNF α , IFN γ and IL-2 are responsible for signal transmission from the innate immunity protein Tag7 (PGLYRP1) to cytotoxic effector lymphocytes // *Cells.* 2020. V. 9. № 12. P. 2602.
4. *Sashchenko L.P., Romanova E.A., Ivanova O.K., et al.* FasL and the NKG2D receptor are required for the secretion of the Tag7/PGRP-S-Hsp70 complex by the cytotoxic CD8⁺ lymphocytes // *IUBMB Life.* 2017. V. 69. № 1. P. 30–36.
5. *Sharapova T.N., Ivanova O.K., Soshnikova N.V., et al.* Innate immunity protein Tag7 induces 3 distinct populations of cytotoxic cells that use different mechanisms to exhibit their antitumor activity on human leukocyte antigen-deficient cancer cells // *J. Innate Immun.* 2017. V. 9. № 6. P. 598–608.
6. *Ivanova O.K., Sharapova T.N., Romanova E.A., et al.* CD3⁺ CD8⁺ NKG2D⁺ T lymphocytes induce apoptosis and necroptosis in HLA-negative cells via FasL-Fas interaction // *J. Cell Biochem.* 2017. Vol. 118, № 10. P. 3359–3366.
7. *Davis D.M. and Dustin M.L.* What is the importance of the immunological synapse? // *Trends Immunol.* 2004. V. 25. № 6. P. 323–327.
8. *Walling B.L., Kim M.* LFA-1 in T Cell Migration and Differentiation. // *Front Immunol.* 2018 May. V. 3. № 9. P. 952. doi: .eCollection 2018. PMID: 29774029 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00952>
9. *Barber D.F., Faure M., Long E.O.* LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity // *J Immunol.* 2004 Sep 15. V. 173. № 6. P. 3653–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3653>
10. *Long E.O.* ICAM-1: getting a grip on leukocyte adhesion // *J. Immunol.* 2011. V. 186. № 9. P. 5021–5023.
11. *Kos F.J. and Chin C.S.* Costimulation of T cell receptor-triggered IL-2 production by Jurkat T cells via fibroblast growth factor receptor 1 upon its engagement by CD56 // *Immunol. Cell. Biol.* 2002. V. 80. № 4. P. 364–369.
12. *Wang Y., Li D., Nurieva R., et al.* LFA-1 affinity regulation is necessary for the activation and proliferation of naive T cells. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 19. P. 12645–12653.

INCUBATION OF LYMPHOCYTES WITH IL-2 CAUSES THE APPEARANCE OF ANTITUMOR T CELLS CARRYING FC, CD25 AND LFA-1 ON THE SURFACE

O. K. Ivanova^{a, #}, T. N. Sharapova^a, E. A. Romanova^a, D. V. Yashin^a, and L. P. Sashchenko^a

^a *Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: olga.k.ivanova@gmail.com*

Presented by Academician of the RAS A.G. Gabibov

To carry out antitumor activity against cells that have lost surface antigens, human lymphocytes must have a certain repertoire of surface proteins capable of contacting a tumor cell and inducing programmed cell death in it. In this work, we showed that activation of healthy donor cells by IL-2 cytokine within 6 days causes the appearance of FasL, CD25 and LFA-1 proteins on CD8⁺CD25⁺ T lymphocytes, and also converts the LFA-1 protein into an active form having a high affinity for its target, ICAM-1 integrin. The appearance of these proteins on the surface of this subpopulation of lymphocytes allows them to induce programmed cell death in HLA-negative tumor cells.

Keywords: Tag7, integrins, FasL, IL-2, tumor cells