

ЭКСПРЕССИЯ ЭРГОТОП-АССОЦИИРОВАННЫХ МАРКЕРОВ АКТИВИРОВАННЫМИ Т-ЛИМФОЦИТАМИ

Королькова О.Ю., Сеньюков В.В., Кожевников В.С.

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

Резюме. Антиэрготипический ответ является одним из механизмов регуляции Т-клеточного иммунного ответа. К эрготоп-ассоциированным антигенам относят молекулы, экспрессия которых увеличивается в процессе Т-клеточной активации (например, молекулы CD25 и hsp60). Антиэрготипические клетки распознают иммуногенные эпитопы эрготопа, представленные на поверхности активированной Т-клетки в комплексе с молекулами МНС I и/или II класса. В данной работе была исследована динамика экспрессии HLA-Dr, CD25, hsp60 и мРНК hTERT Т-лимфоцитами периферической крови здоровых доноров в культуре в ответ на стимуляцию анти-CD3-антителами и IL-2 с реактивацией на 7 сутки. Процент Т-клеток, экспрессирующих CD25, резко увеличивался (до 90% и более) уже на 3 сутки активации и далее практически не изменялся либо уменьшался незначительно. Содержание hsp60 сначала также возрастало, пик наблюдался на 3 сутки, затем количество белка постепенно снижалось. Экспрессия HLA-Dr увеличивалась по мере активации, с пиком на 8 или 10 сутки. Количество мРНК hTERT также повышалось по сравнению с исходным, с двумя пиками активации: на 3 и на 8 сутки. Антиэрготипический ответ может контролировать аутоиммунитет в отношении активированных Т-клеток, независимо от их антигенной специфичности, поэтому иммунотерапия различных аутоиммунных заболеваний, нацеленная на активацию антиэрготипического ответа, может представлять клинический интерес.

Ключевые слова: эрготоп, антиэрготипическая регуляция, Т-лимфоциты.

Korolkova O. Yu., Senyukov V. V., Kozhevnikov V. S.

EXPRESSION OF ERGOTOPE-ASSOCIATED MARKERS BY ACTIVATED T-LYMPHOCYTES

Abstract. Anti-ergotypic response is considered to contribute significantly to the regulation of immune response. Ergotope-associated antigenic determinants include molecules upregulated on the surface of activated T cells (CD25, hsp60 and others). Anti-ergotypic cells are directed against these surface determinants usually complexed to MHC-I and/or MHC-II. Here we demonstrate regulated expression of HLA-Dr, CD25, hsp60 and hTERT mRNA during *in vitro* activation of peripheral T-lymphocytes with anti-CD3 antibodies and IL-2, with reactivation on day 7. The percentage of CD25-expressing T cells showed sharp increase as early as by the day 3 of activation, and it varied only slightly at later terms. The hsp60 levels rose as well, reached a peak at day 3, and gradually decreased thereafter. HLA-Dr expression was induced upon the activation, with a peak at the days 8 or 10. hTERT mRNA amounts also increased, as compared with baseline values, showing two peaks at the days 3 and 8. Anti-ergotopic response may control autoimmunity by targeting the activated T cells, regardless of their specificity. Therefore, immunotherapy of different autoimmune disorders aiming to activate anti-ergotopic responses, may be of a sufficient clinical interest. (*Med. Immunol.*, vol. 11, N 2-3, pp 255-260)

Адрес для переписки:

Королькова Ольга Юрьевна,
ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН
630004, г. Новосибирск, ул. Залесского, д. 6, корп. 9
(клиника иммунопатологии).
Тел.: (383) 228-21-20.
Факс: (383) 225-05-22.
E-mail: korolkova82@gmail.com

Введение

В процессе созревания в тимусе Т-лимфоциты подвергаются процессам позитивной и негативной селекции, в результате чего более 98% тимоцитов погибает; таким образом из предсуществующего огромного разнообразия Т-клеточных рецепторов отбираются те, с помощью которых формируется периферический репертуар

Т-лимфоцитов. Известно, что некоторое количество аутореактивных клонов лимфоцитов все же избегает негативной селекции и присутствует в репертуаре даже нормального организма. Однако случайная активация аутореактивных Т-клеток обычно не может привести к развитию аутоиммунного заболевания благодаря наличию механизмов контроля иммунного ответа на свои, а также на чужеродные антигены. К настоящему времени описано довольно большое количество различных типов клеток-регуляторов на основании их фенотипов и механизмов действия [13], в том числе антиидиотипические и антиэрготипические регуляторные клетки [1].

Антиидиотипические Т-лимфоциты распознают, по определению, клон-специфические антигенные детерминанты, например CDR3-регион Т-клеточного рецептора, то есть пептид, который уникален для каждого конкретного клона Т-лимфоцитов. Антиэрготипический ответ, наоборот, направлен на антигенные детерминанты, которыми являются активационные маркеры, и которые могут быть общими для всех активированных, но не покоящихся клеток, вне зависимости от их специфичности. Эрготопом может служить любая молекула, которая удовлетворяет трем условиям. Во-первых, ее уровень экспрессии, а также презентации на поверхности Т-лимфоцитов должен увеличиваться в результате Т-клеточной активации. Во-вторых, эта молекула должна презентироваться на поверхности клетки, обычно в комплексе с МНС I и/или II. В-третьих, эрготоп должен распознаваться регуляторными Т-клетками, что, в свою очередь, должно приводить к их активации [1, 10].

Примером эрготопа служит молекула CD25, существование антиэрготипического ответа к которой, включающего распознавание CD25 антиэрготипическими клетками, их пролиферацию и формирование цитотоксических Т-лимфоцитов показано во многих исследованиях [1, 8, 10]. Целью данного исследования является анализ экспрессии различных эрготоп-ассоциированных маркеров в процессе неспецифической активации Т-лимфоцитов *in vitro*. В соответствии с этим молекула CD25 была включена нами в список исследуемых в данной работе эрготопов, как была включена и молекула белка теплового шока (heat shock protein) hsp60, экспрессия которой, как было продемонстрировано, увеличивается в активированных клетках, в том числе на поверхности этих клеток, более того, показано наличие hsp60-специфических Т-клеток и антител к hsp60 в периферической крови здоровых доноров [9]. Также мы исследовали содержание в лимфоцитах мРНК каталитической субъединицы фермента теломеразы (hTERT — human telomerase reverse

transcriptase), которая, как мы предполагаем, потенциально тоже может быть рассмотрена в качестве эрготоп-ассоциированного маркера.

Материалы и методы

Материалы. В исследовании была использована периферическая кровь условно здоровых доноров, а также клетки опухолевой линии BRO. Были использованы моноклональные антитела (МА) к HLA-Dr и hsp-60, меченые флюоресцеином изотиоцианатом (FITC); МА к CD25, меченые фикоэритрином (PE); МА к CD4, меченые перидинин хлорофилл протеином (PerCP); МА к CD3, меченые аллофикоцианином (APC) (Сорбент, Россия; BD Biosciences Pharmingen, USA). Пептидонуклеиновый (PNA) зонд, меченный FITC, был произведен Bio-Synthesis, USA. Цитометрический анализ данных проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) с помощью программного обеспечения Cell QuestPRO (Becton Dickinson, USA).

Получение МНК периферической крови. Периферическую кровь, стабилизированную гепарином, центрифугировали в градиенте фиколл-верографин в течение 20 минут при 2,7 тыс. об/мин в медицинской лабораторной центрифуге, после чего кольцо моноклеарных клеток (МНК) собирали и отмывали дважды с забуференным физиологическим раствором с ЭДТА и аэдом Na (ЗФР-ЭА) по 5 минут при 1 тыс. об/мин. Осадок ресуспендировали в ЗФР-ЭА и подсчитывали количество клеток в камере Горяева.

Культивирование лимфоцитов периферической крови. Выделенные из периферической крови МНК помещали в лунки 24-луночного планшета в концентрации 2 млн на 1 мл питательной среды RPMI 1640 с 10% FCS, 1 мкг/мл анти-CD3 -антител и 100 ед/мл IL-2. Часть клеток отбирали и замораживали в FCS с 10% DMSO на определенные сутки культивирования в соответствии с избранной схемой. Часть клеток замораживали интактно непосредственно после их выделения.

Поверхностное маркирование лимфоцитов. Интактные или культивированные лимфоциты периферической крови после разморозки и отмывки с ЗФР-ЭДТА окрашивали моноклональными антителами к CD3, CD4, CD25 и HLA-Dr в количестве, рекомендуемом производителем. После этого клетки отмывали ЗФР-ЭДТА, переносили в цитометрические пробирки с 500 мкл лизирующе-фиксирующего раствора и определяли процент клеток, несущих на себе исследуемые маркеры, с помощью проточной цитометрии.

Определение содержания внутриклеточного hsp60 в лимфоцитах. Интактные или культивированные лимфоциты периферической крови после разморозки и отмывки с ЗФР-ЭДТА окрашивали

сначала антителами к требуемым поверхностным маркерам, как описано выше. Затем клетки фиксировали 1% параформальдегидом, пермеабелизовали 0,2% Tween-20 и окрашивали моноклональными антителами к hsp60 (титр антител составлял 1/80). После двух отмывок клетки ресуспендировали в 500 мкл 3ФР-ЭДТА. Анализ проб проводили на проточном цитофлуориметре.

Определение содержания мРНК hTERT методом Flow-FISH. Для гибридизации использовали 106 клеток на одну пробу. Исходя из этого необходимое количество клеток осаждали центрифугированием и ресуспендировали осадок в гибридизационном растворе, содержащем 30% формамид, 20 mM Tris (pH 7,2) и 1% BSA и доведенный до конечного объема водой. Гибридизацию каждой пробы проводили в объеме 300 мкл. Контрольная проба содержала только клетки, ресуспендированные в гибридизационном растворе. К опытной пробе добавляли PNA зонд, комплементарный участку мРНК hTERT, в конечной концентрации 0,8 мкг/мл. Все пробы денатурировали в течение 10 минут при 80 °C. Гибридизация проводилась в темноте при комнатной температуре в течение 2 часов при постоянном перемешивании. После этого клетки переносили в цитометрические пробирки с отмывочным раствором, содержащим 30% формамид, 10 mM Tris (pH 7,2) и 0,1% BSA и осаждали; далее отмывали дважды аналогичным образом в 3ФР-ЭА. к осадку добавляли 3ФР-ЭА с 1 мкг 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) для отделения одинарных клеток при дальнейшем анализе проб на проточном цитофлуориметре. Наличие мРНК hTERT в одинарных клетках определяли как средний уровень их флуоресценции по сигналу флуорохрома FITC после гибридизации в присутствии PNA зонда за вычетом фоновой (аутофлуоресценции) клеток, прошедших те же условия в отсутствии PNA зонда.

Статистическая обработка. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Достоверность динамики изменения изучаемых параметров в процессе активации лимфоцитов оценивали с использованием дисперсионного анализа (ANOVA). Результат приводится в виде F-критерия, проверяющего, является ли различие внутригрупповых дисперсий статистически значимым.

Результаты

Схема активации лимфоцитов в культуре. Для определения динамики различных эрготоп-ассоциированных маркеров в Т-лимфоцитах периферической крови мы культивировали выделенные из периферической крови МНК в при-

сутствии анти-CD3-антител и IL-2. На основании литературных данных и предварительных экспериментов, результаты которых здесь не приводятся, была избрана следующая схема. Культивируемые МНК замораживали для определения исследуемых маркеров на 3, 7, 8 и 10 сутки, причем на 7 сутки производили реактивацию.

Динамика экспрессии CD25. Процент Т-клеток, экспрессирующих CD25, составлял в интактных клетках 32% на CD4⁺Т-лимфоцитах и 6% на CD8⁺ Т-лимфоцитах (средние значения). Уже на 3 сутки активации этот процент резко увеличивался до 90% и более и впоследствии практически не изменялся либо уменьшался незначительно (рис. 1А). Динамика изменения экспрессии CD25 в процессе активации статистически достоверна: F-критерий для CD4⁺Т-лимфоцитов составляет 160,78 ($p < 0,001$), для CD8⁺ 63,84 ($p < 0,001$).

Динамика экспрессии hsp60. Исходно около 5,3% как CD4⁺, так и CD8⁺ лимфоцитов экспрессировали hsp60. По сравнению с этим значением содержание hsp60 сначала возрастало, с пиком, наблюдающимся на 3 сутки и составляющим 17% в CD4⁺ и 26% в CD8⁺ лимфоцитах, затем количество hsp60 снижалось, хотя после реактивации экспрессия этой молекулы снова увеличивалась до 11 и 15% в CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитах соответственно (рис. 1Б). Тем не менее статистически достоверных изменений динамики этот показатель не достигал: F-критерий составил 0,27 для CD4⁺ ($p > 0,05$) и 0,51 для CD8⁺ Т-клеток ($p > 0,05$).

Динамика экспрессии HLA-Dr. Молекула эрготопы, как уже упоминалось, должна быть процессирована и презентирувана на поверхности активированной клетки в комплексе с МНС I или МНС II [1, 10]. Повышение экспрессии МНС II активированными Т-клетками говорит об увеличении их способности презентировать антиген, в том числе презентировать эрготопы, что в свою очередь ведет к более качественной регуляции антиэрготипического Т-клеточного ответа, поэтому мы также оценивали уровень экспрессии HLA-Dr на Т-лимфоцитах. Экспрессия HLA-Dr непрерывно повышалась по мере активации, независимо от реактивации, с пиком на 8 или 10 сутки (для CD4⁺ $F = 8,5$ при $p < 0,001$, для CD8⁺ $F = 13,96$ при $p < 0,001$). Процент клеток, несущих на себе HLA-Dr, повышался в среднем с 5 до 57% в CD4⁺ и с 13 до 76% в CD8⁺ лимфоцитах (рис. 1В).

Динамика экспрессии мРНК hTERT. Известно, что теломераза экспрессируется в периферических лимфоцитах на небольшом уровне, причем ее экспрессия может быть увеличена путем активации лимфоцитов [14]; также есть данные об экспрессии различных эпигенов hTERT

на поверхности клеток в комплексе с МНС II, и в норме в периферической крови существуют лимфоциты, специфичные к этим эпитомам [11, 12]. Исходя из этого мы также определяли содержание в лимфоцитах мРНК каталитической субъединицы теломеразы как возможного эрготоп-ассоциированного маркера. Экспрессию мРНК теломеразы мы оценивали методом Flow-FISH, который был модифицирован нами ранее для полуколичественной оценки содержания мРНК теломеразы. Подробно он описан в разделе «Материалы и методы». В качестве стандарта гибридизации параллельно определяли относительное количество мРНК hTERT в клетках человеческой опухолевой линии BRO. Относительное количество мРНК в исследуемых клетках приводится как процент относительно опухоли. Количество мРНК hTERT как в CD4⁺, так и в CD8⁺ лимфоцитах достоверно повышалось по сравнению с исходным (для CD4⁺ F = 15,68 при p < 0,001, для CD8⁺ F = 17,42 при p < 0,001), с двумя пиками активации: на 3 и на 8 сутки активации, причем

максимальное значение наблюдалось на 3 сутки и этого уровня экспрессия мРНК теломеразы больше не достигала, даже после реактивации (рис. 1Г).

Обсуждение

В течение последних лет были накоплены данные о различных регуляторных популяциях Т-лимфоцитов [1, 8]. Тем не менее об антиэрготипической регуляции известно сравнительно мало.

Антиэрготипический ответ можно исследовать с точки зрения трех его различных составляющих: Т-лимфоцит, являющийся мишенью; собственно эрготоп и антиэрготипическая клетка. Способность Т-клеток участвовать в этих регуляторных взаимодействиях в качестве мишени отражается экспрессией МНС, причем многие антиэрготипические регуляторы не являются даже МНС-I или МНС-II рестриктированными [4, 6]. Активированные клетки являются лучшими антиген-презентирующими клетками,

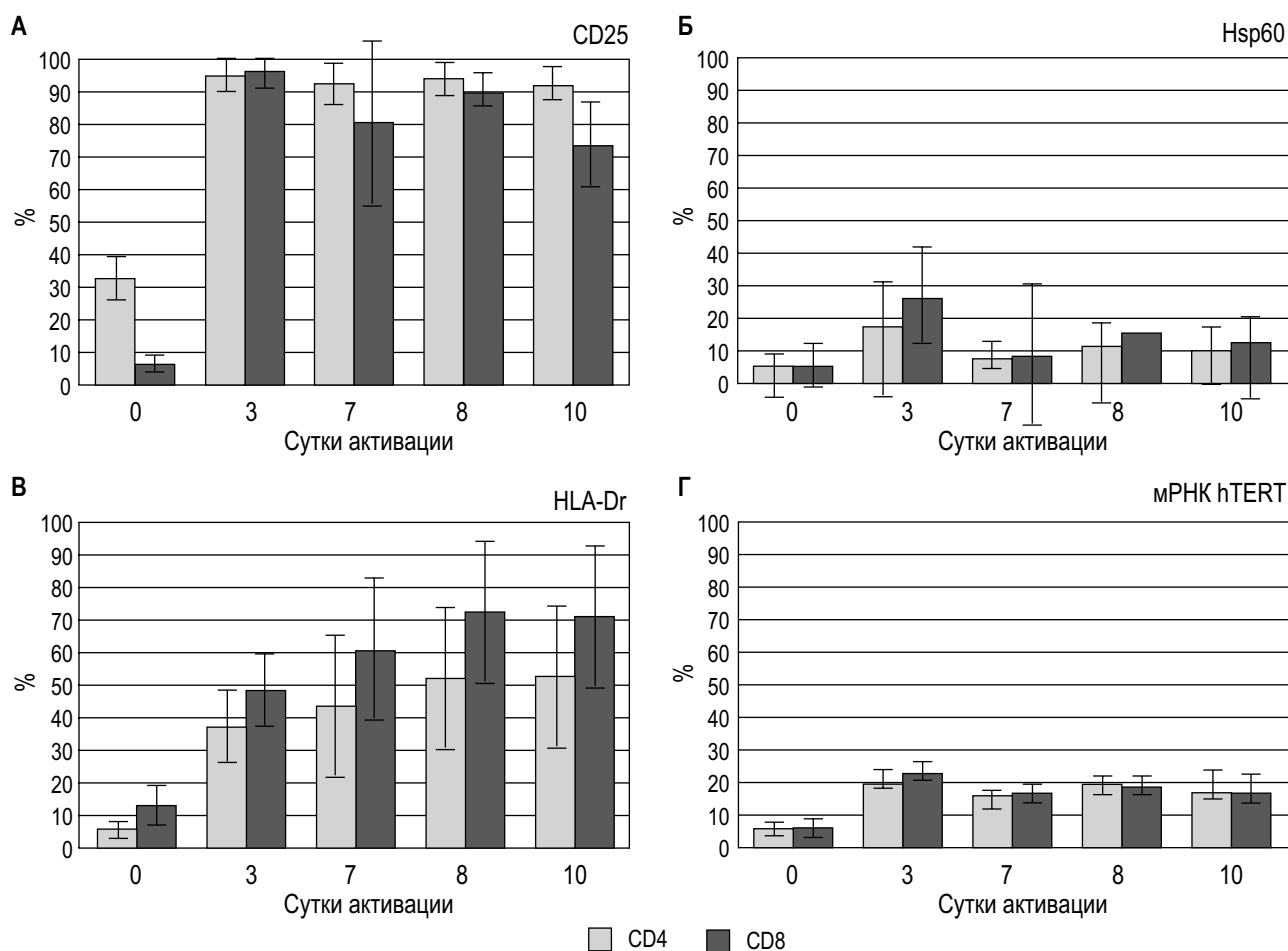


Рисунок 1. Динамика экспрессии лимфоцитами различных эрготоп-ассоциированных маркеров интактно и после 3, 7, 8 и 10 суток их стимуляции в культуре с анти-CD3-антителами

Примечания. А – CD25; Б – hsp60; В – HLA-Dr; Г – мРНК hTERT (приводится как процент относительно содержания мРНК hTERT в опухолевой линии BRO).

чем покоящиеся, и по этой причине предпочтительнее используются в Т-клеточных вакцинах. Известное повышение экспрессии HLA-Dr активированными клетками, полученное и в нашем исследовании, отражает именно такое улучшение их презентующей способности, что гарантирует их последующий контроль антиэрготипическими регуляторами, независимо от антигенной специфичности этих мишеней к своим или чужеродным антигенам.

Более подробно мы исследовали экспрессию молекул эрготопов клетками-мишенями. Одним из исследуемых нами эрготопов явилась альфа-цепь рецептора IL-2 (CD25). Предположение, что эта молекула может служить эрготопом, было основано на факте, что она индуцируется в процессе Т-клеточной активации, что показано и в нашем исследовании: на рисунке 1 отражено немедленное и сильное увеличение экспрессии CD25 при активации Т-клеток. В литературе существуют данные, что Т-клетки, специфичные к эпитопу CD25, предотвращают развитие ЕАЕ [8], а также что вакцинация CD25 модулирует именно антиэрготипический ответ [7].

Динамика содержания белка теплового шока hsp60 в активированных клетках, продемонстрированная нами, поддерживает теорию, что hsp60 также является эрготопом. Действительно, в литературе показано, что этот белок может презентироваться на поверхности клетки в виде различных пептидов, к некоторым из которых специфичны клетки, предсуществующие в периферической крови нормального организма [9]. Такой врожденный ответ на hsp60 имеет значение для регуляции гомеостаза и контроля патогенеза артрита, диабета и других заболеваний.

К потенциальным эрготопам мы также относим каталитическую субъединицу теломеразы. Известно, что экспрессия теломеразы в лимфоцитах регулируется в течение их развития и активации. Стимуляция лимфоцитов приводит к повышению в них активности теломеразы, чему соответствует экспрессия мРНК hTERT в этих лимфоцитах [14]. Способность к индукции этого фермента в результате активации может не только определять потенциал пролиферации лимфоцитов, но и давать дополнительную возможность антиэрготипической регуляции, при которой пептиды hTERT, презентруемые на поверхность клетки, выполняют роль активационных маркеров, к которым специфичны определенные регуляторные клетки. Наличие клеток и антител, специфичных к hTERT и обнаруженных в норме в периферической крови [11, 12], доказывает возможность функционирования некоторых эпитопов hTERT в качестве эрготопов.

Итак, нами продемонстрирована экспрессия определенных маркеров Т-клетками в процессе их активации. В литературе показано, что другие, регуляторные, Т-клетки могут распознавать эти маркеры в качестве антигенных детерминант, что может отражать механизмы регуляции клональной экспансии Т-лимфоцитов, а также таким образом иммунная система может исключать возможность активации аутореактивных клонов лимфоцитов. В пользу этой теории говорит также показанное в литературе снижение антиэрготипической регуляции при аутоиммунных заболеваниях [8]. В совокупности с теми данными, что впервые антиэрготипическая регуляция была показана в модели Т-клеточной вакцинации [7], можно представить потенциал терапевтических подходов, которые будут базироваться на более глубоком понимании иммунорегуляторных взаимодействий. Один из таких подходов, основанный на антиэрготипических регуляторных взаимодействиях, разработан и успешно применялся для терапии некоторых аутоиммунных и аллергических заболеваний [1, 2].

Выводы

1. Исследованная в данной работе динамика экспрессии эрготоп-ассоциированных маркеров Т-лимфоцитами отражает степень их активации и, таким образом, возможность быть мишенями для эрготоп-специфических клеток.

2. Пик экспрессии большинства исследованных эрготоп-ассоциированных маркеров выявляется на 3 сутки стимуляции в культуре, что необходимо учитывать при подготовке Т-клеточных вакцин на основе активированных Т-клеток.

Список литературы

1. Способ лечения атопического дерматита / Кожевников В.С., Баровская Н.А., Королькова О.Ю., Непомнящих В.М., Леонова М.И., Демина Д.В. — № 2007112582/14 (013652), заявка на изобретение, приоритет от 04.04.07, дата положительного решения 05.05.2008. Находится на публикации.
2. Способ лечения ревматоидного артрита / Кожевников В.С., Королькова О.Ю., Ильина Н.А., Сизиков А.Э., Коненков В.И., Коненкова Л.П. — № 2007112187/17 (013244), заявка на изобретение, приоритет от 02.04.07, дата положительного решения 06.05.2008. Находится на публикации.
3. Cohen I.R., Quintana F. J., Mimran A. Tregs in T cell vaccination: exploring the regulation of regulation // J Clin Invest. — 2004. — Vol. 114. — P. 1227-1232.

4. Correale J, Rojany M, Weiner L.P. Human CD8⁺ TCR-alpha beta(+) and TCR-gamma delta(+) cells modulate autologous autoreactive neuroantigen-specific CD4⁺ T-cells by different mechanisms // J. Neuroimmunol.
5. Hellings N., Raus J., Stinissen P. T cell vaccination in multiple sclerosis: update on clinical application and mode of action // Autoimmunity Reviews. — 2004. — Vol. 3. — P. 267-275.
6. Jiang, H., Chess, L. The Specific Regulation of Immune Responses by CD8⁺ T Cells Restricted by the MHC Class Ib Molecule, Qa-1 // Annual Review of Immunol. — 2000. — Vol. 18. — P. 185-216.
7. Lohse A.W., Mor F., Karin N., Cohen I.R. Control of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cells responding to activated T cells // Science. — 1989. — Vol. 244. — P.820-822.
8. Mimran A., Mor F., Carmi P., Quintana F.J., Rotter V., Cohen I.R. DNA vaccination with CD25 protects rats from adjuvant arthritis and induces an anti-ergotypic response // J. Clin. Invest. — 2004. — Vol. 113. — P. 924-932.
9. Quintana F.J., Carmi P., Mor F., Cohen I.R. DNA Fragments of the Human 60-kDa Heat Shock Protein (HSP60) Vaccinate Against Adjuvant Arthritis: Identification of a Regulatory HSP60 Peptide // The Journal of Immunology. — 2003. — Vol. 171. — P. 3533-3541.
10. Quintana F.J., Cohen I.R. Anti-ergotypic Immunoregulation // Scand. J. Immunol. — 2006. — Vol. 64. — P. 205-210.
11. Schroers R., Huang X.F., Hammer J., Zhang J., Chen S. Identification of HLA DR7-restricted Epitopes from Human Telomerase Reverse Transcriptase Recognized by CD4 T-Helper Cells // Cancer research. — 2002. — Vol. 62. — P. 2600-2605.
12. Schroers R., Shen L., Rollins L., Rooney C.M., Slawin K., Sonderstrup G., Huang X.F., Chen S. Human Telomerase Reverse Transcriptase-Specific T-Helper Responses Induced by Promiscuous Major Histocompatibility Complex Class II-Restricted Epitopes // Clinical Cancer Research. — 2003. — Vol. 9. — P. 4743-4755.
13. Skapenko A., Leipe J., Lipsky P.E., Schulze-Koops H. The role of the T cell in autoimmune inflammation // Arthritis Research & Therapy. — 2005. — Vol. 7. — N 2. — P. 4-14.
14. Weng N.P., Levine B.L., June C.H., Hodes R.J. Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation // The Journal of Experimental Medicine. — 1996. — Vol. 183. — P. 2471-2479.

*поступила в редакцию 28.12.2008
отправлена на доработку 03.02.2009
принята к печати 20.02.2009*