

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНДУКЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ИММУННОГО ОТВЕТА МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ С ПОМОЩЬЮ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ТРАНСФЕЦИРОВАННЫХ ПОЛИЭПИТОПНЫМИ КОНСТРУКЦИЯМИ HER2/ERBB2

Максютов А.З., Лопатникова Ю.А., Курилин В.В., Шевченко Ю.А.,
Хантакова Ю.Н., Гаврилова Е.В., Максютов Р.А., Перегудов А.Г.,
Зайцев С.А., Козлов В.А., Сенников С.В.

ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Резюме. В работе представлен дизайн генетических конструкций, кодирующих универсальный и HLA-A*0201-специфический полиэпитопные иммуногены, содержащие антигенные детерминанты белка HER2. Показано, что трансфекция зрелых дендритных клеток полиэпитопными конструкциями с помощью магнитных наночастиц приводила к эффективной стимуляции цитотоксического иммунного ответа в культуре моноклеарных клеток HLA-A*0201-позитивных здоровых доноров, оцениваемого по стимулированной гибели HLA-A*0201- и HER2-позитивных опухолевых клеток линии MCF-7 и экспрессии перфориновых гранул.

Ключевые слова: цитотоксичность, полиэпитопные конструкции, дендритные клетки, трансфекция

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2014-5-417-424>

Введение

В настоящее время ведется активный поиск опухолевых антигенов, которые позволили бы создать таргетную терапию в отношении злокачественных клеток. Рак молочной железы в настоящее время является распространенным

злокачественным новообразованием среди женщин, являющимся одной из наиболее частых причин смерти женщин по сравнению с другими формами злокачественных новообразований [2, 13]. От 10 до 35 % случаев рака груди у женщин характеризуются увеличенной экспрессией белка

Авторы:

Максютов А.З. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия
Лопатникова Ю.А. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия
Курилин В.В. — к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия
Шевченко Ю.А. — к.б.н., научный сотрудник, лаборатория молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия
Хантакова Ю.Н. — аспирант, лаборатория молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия
Гаврилова Е.В. — к.б.н., научный сотрудник, лаборатория молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия
Максютов Р.А. — к.б.н., научный сотрудник, лаборатория молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия
Перегудов А.Г. — младший научный сотрудник, лаборатория молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия
Зайцев С.А. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия
Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия
Сенников С.В. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Адрес для переписки:

Сенников Сергей Витальевич
д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН 630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14, оф. 301-309.
Тел.: 8 (383) 222-19-10.
E-mail: sennikov_sv@mail.ru

Поступила 15.10.2013
Принята к печати 21.11.2013

© Максютов А.З. и соавт., 2014

HER2, также ассоциированного с более агрессивным течением процесса и плохим прогнозом [4, 19]. Белок HER2, кодируемый геном ErbB2, — член семейства рецепторов эпидермальных факторов роста, регулирующих клеточную пролиферацию, дифференцировку, миграцию и адгезию [19]. Увеличение экспрессии HER2 приводит к супрессии апоптоза и активации пролиферации, что может стимулировать опухолевый процесс [9].

Создание конструкций, несущих опухолевые специфические белки и/или их наиболее активные эпитопы, является еще одним шагом в направлении индукции противоопухолевого иммунитета [3].

Данное исследование посвящено экспериментальной проверке эффективности индукции формирования цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток с помощью дендритных клеток (ДК), трансфицированных генетическими конструкциями на основе опухоли-ассоциированных антигенов.

Материалы и методы

В исследовании использовалась периферическая кровь условно здоровых доноров, несущих по результатам генотипирования (набор ALLSET™ GOLD HLA A LOW RES SSP [«Invitrogen», США]) аллель HLA-A02.

Получение ДНК-конструкций

Цитотоксические Т-клеточные эпитопы, использованные для получения «универсальных» иммуногенов, были отобраны с помощью программы TEPredict [1] в составе HER2 белка (P04626.1), с учетом основных шагов МНС I-рестриктированной презентации антигена — протеасомной деградацией [23], и пептидного связывания с TAP (Transporters associated with antigen processing) [18]. Пептиды, не имеющие по прогнозам сайта протеасомной деградации на С-конце или неэффективные при связывании с TAP, были исключены из дальнейшего анализа. Таким образом, был выбран минимальный набор из 35 МНС I-рестриктированных пептидов с пятикратным перекрытием. Выбранные эпитопы были объединены в более длинные пептиды, если они перекрывались в рамках исходной последовательности HER2. Пептиды, отобранные с использованием либо TEPredict, либо NetMHC [1, 16], как HLA-A0201-связывающие, были выбраны для построения HLA-A*0201-специфичного иммуногена в том же порядке. HLA-A0201 аллель был выбран как наиболее часто встречающийся в человеческой популяции. Индивидуальные гены с модифицированными кодонами, оптимизированные для экспрессии в клетках

млекопитающих, были синтезированы на основе «универсальных» полиэпитопных иммуногенов и HLA-A0201-специфических последовательностей. ДНК была клонирована в эукариотическом векторе pDNAVACCultra5 (Nature Technology Corporation, США) непосредственно после CMV промотора. Трансформация *E. coli* (штамм XL2blue) каждой из ДНК-плазмид подтверждалась результатами рестрикции и секвенированием ДНК. Плазмидную ДНК получали из соответствующих клонов, очищали с использованием EndoFree Plasmid Giga Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией завода-изготовителя и повторно ресуспендировали в стерильном PBS. Концентрацию ДНК определяли методом УФ-спектроскопии. Для исследования функциональных свойств были получены ДНК-конструкции на основе ДНК-вектора pDNAVACCultra5, кодирующие «универсальные» полиэпитопные иммуногены (pDNA5-BC-U [плазмида (U)], HLA-A*0201-специфичные полиэпитопные иммуногены (pDNA5-BC-A [плазмида (A)]) и полноразмерный антиген HER2 (pDNA5-HER2 [плазмида (ErbB2)]).

Среды и реагенты

Культуральные среды RPMI-1640 («Биолот» Россия), фикокол (Bioclot), урографин (Schering AG), эмбриональная сыворотка телят (FCS, HyClone), 2-меркаптоэтанол (Sigma), L-глутамин (Биолот, Россия), гентамицин (KRKA, Словения), ампициллин (Синтез, Курган), 96-луночные планшеты, чашки Петри (TPP, Швейцария), 48-луночные планшеты (Cellstar, США). Рекомбинантные человеческие цитокины: IL-4, GM-CSF, TNF α (Bio-Vision).

Получение ДК

Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови условно здоровых доноров получали стандартным методом на градиенте фиколаурографина. Клетки с повышенной адгезивной способностью выделяли с помощью инкубации на пластике в течение 2 часов, при 5% CO₂ и 37°C. К прилипшей фракции МНК добавляли 50 нг/мл GM-CSF, 100 нг/мл IL-4 на 4 суток для получения незрелых ДК. Для созревания добавлялся TNF α (25 нг/мл) в течение 24 часов. Фракция неприлипших клеток культивировалась культуральном флаконе в концентрации 2 млн/мл, в объеме 1 мл в полной среде RPMI-1640 до проведения процедуры ссаживания. Магнитная трансфекция осуществлялась на стадии зрелых ДК согласно инструкции фирмы Promokine. Оценка эффективности трансфекции проводилась с помощью набора для ник-трансляции Promo-Fluor-500 Nick Translation Labeling Kit («Promokine»), с дальнейшим анализом на проточном цитофлуориметре с использованием метода Flow-FISH [20]. В ка-

честве контроля использовались ДК, для которых не проводилась процедура трансфекции (ДК [0]) и ДК, трансфицированные ДНК-вектором pDNAVACCUltra5 (плазмида [p5]), не содержащим вставок иммуногенных пептидов.

Оценку фенотипа ДК проводили методом проточной цитометрии на приборе FACS Aria (Becton Dickinson, США), с использованием соответствующих моноклональных антител CD3-FITC, CD14-PE, HLA-DR-FITC, CD11c-PE, CD209-PerCP-Cy5.5, CD86-FITC, CD83-PE (Becton Dickinson, США). Способность ДК к эндоцитозу, как показатель функциональной активности, оценивалась по захвату FITC-Dextran (Sigma) с последующим анализом на проточном цитофлуориметре FACS Aria (Becton Dickinson, США) [17].

Совместное культивирование мононуклеарных клеток, истощенных по моноцитарной фракции, и ДК в соотношении 10:1 проводилось в 48-луночных планшетах в течение 4 суток. Для определения содержания перфорин-позитивных клеток анализируемые клетки фиксировали, пермеабелизировали 0,2% Tween 20 и инкубировали с моноклональными антителами к перфорину. Количество перфорин-позитивных клеток определяли методом проточной цитометрии в лимфоцитарном регионе.

Анализ цитотоксического эффекта мононуклеарных клеток, культивированных с трансфицированными ДК, против опухолевых клеток линии аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 (банк клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург) проводился с помощью оценки содержания в кондиционной среде лактатдегидрогеназы (ЛДГ), высвободившейся из лизированных клеток. Процедура проводилась согласно инструкции производителя набора («Promega»).

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов производилась при помощи программы «Statistica 6.0». При ненормальном распределении выборки, для статистической проверки использовались непараметрические критерий Вилкоксона, данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

Результаты

Структура универсальных и HLA-A*0201 специфических цитотоксических Т-клеточных эпитопов

Отобранные фрагменты HER2 и HLA-A0201-специфичные пептиды были объединены, соответственно, в «универсальные» (рис. 1А) и HLA-A*0201-специфические (рис. 1Б) поли-CTL-эпитопы. Структура эпитопов оптимизировалась выбором соответствующего пар-

сочетания эпитопов, подходящих спейсеров для каждой пары эпитопов и оптимального расположения эпитопов в пределах конструкции, с целью увеличения эффективности процессинга полиэпитопа и презентации целевых эпитопов. В состав поли-Th фрагмента был включен универсальный иммуногенный пептид PADRE (Pan DR Т-хелперный эпитоп – AKFVAAWTLKAAA). Пептиды были соединены через двухосновные К/Р-К/Р мотивы, необходимые для расщепления лизосомальными катепсинами В и L, участвующими в процессинге эндоцитированных антигенов [25, 11]. Этот поли-Т-хелперный эпитоп является общим для обоих полиэпитопных иммуногенов (рис. 1). N-концевой лидерный пептид (рис. 1) был разработан по аналогии с оригинальным HER2 сигнальным пептидом с использованием веб-сервера SignalP [5]. Последние 11 аминокислот человеческого белка LAMP-1 были выбраны в качестве С-концевого сортировочного сигнала [1], который был непосредственно слит с С-концом поли-Th фрагмента. Затем поли-CTL эпитоп с N-концевой лидерной последовательностью и поли-Th эпитоп с С-концевой частью LAMP-1 были объединены через спейсер, формирующий протеасомный сайт расщепления на С-конце поли-CTL участка (рис. 1). Методами ник-трансляции и Flow-FISH было подтверждено, что эффективность магнитной трансфекции достигала более чем 40%.

Получение дендритных клеток, оценка их фенотипа и функциональной активности

Для оценки популяционного состава полученных ДК проводилось фенотипирование незрелых и зрелых ДК с помощью специфических антител к поверхностным маркерам, описанным в литературе как маркеры дендритных клеток [12, 17, 22]. Для незрелых и зрелых ДК были показаны статистически достоверные различия по следующим основным маркерам: CD14 (10,25 и 1,75% соответственно), CD83 (24,25 и 37,95% соответственно), CD83/86 (22,85 и 37,45% соответственно).

Для оценки функциональной активности был проведен анализ захвата декстрана незрелыми и зрелыми ДК. Степень захвата FITC-декстрана ДК определялась как относительная величина соответствующая соотношению интенсивности флуоресценции меченых клеток при 37 °С и 4 °С что подразумевает специфическую эндоцитозную (при 37 °С) и неспецифическую активность (4 °С) соответственно. Было показано, что зрелые ДК обладают меньшей активностью в захвате антигена, чем незрелые ДК, способные к эффективному захвату антигена по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза [14], что подтверждает направленное созревание и диф-



Рисунок 1. Структура полиэпитопных иммуногенов HER2

Примечание. А. Универсальный полиэпитопный иммуноген. Б. HLA-A*020-специфический полиэпитопный иммуноген. Спейсерные последовательности выделены серым цветом. Оба полиэпитопа состоят из соответствующих поли-CTL-эпитопов и общего поли-Th-эпитопа фрагмента (выделено рамкой). Начальные позиции CTL-эпитопов показаны жирным шрифтом. Общие N-концевые лидерные пептиды показаны белым шрифтом на черном фоне, 11 аминокислотных остатков человеческого LAMP-1 белка C-концевой части показаны подчеркнутым белым жирным шрифтом на черном фоне. Последовательность PADRE выделена подчеркнутым жирным шрифтом.

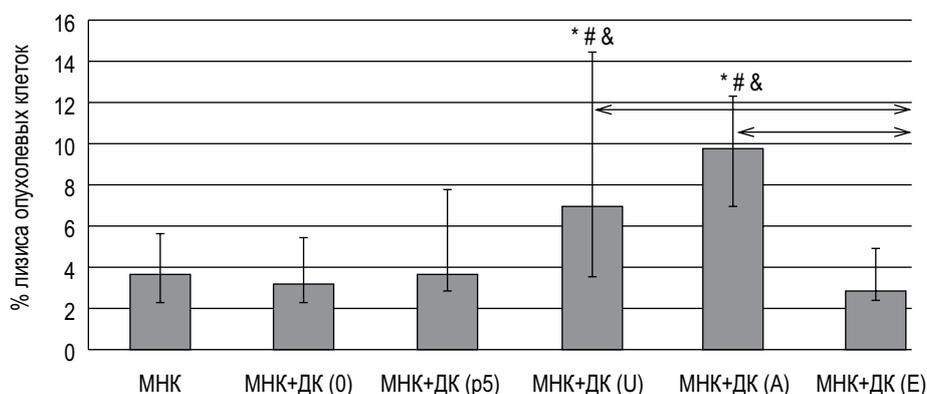


Рисунок 2. Цитотоксическая активность совместной культуры МНК HLA-A02-позитивных здоровых доноров и аутологичных трансфицированных ДК против клеток линии MCF-7 (n = 8)

Примечание. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

*, #, & – статистически значимые различия с контрольными группами МНК, МНК+ ДК (0), МНК+ ДК (p5) соответственно. Стрелками обозначены статистически значимые различия

ференцировку ДК из моноцитов периферической крови.

Таким образом, ДК, полученные в использованном клеточном протоколе, обладают фенотипическими и функциональными особенностями данной популяции клеток.

Поскольку протективный противоопухолевый иммунный ответ включает в себя разрушение злокачественных клеток-мишеней, то была проведена оценка цитотоксической активности МНК, активированных трансфицированными ДК, против опухолевых клеток линии MCF-7, которые несут на своей поверхности антигены HLA-A0201 и HER2 с помощью количественного определения содержания цитозольного фермента лактатдегидрогеназы, выделяющегося из лизированных клеток.

В результате проведенного эксперимента установлено, что трансфекция ДК универсальной

и аллель-специфичной плазмидами приводит к достоверно большей цитотоксической активности мононуклеарных клеток при совместном культивировании против опухолевых клеток по сравнению с группами МНК, и МНК совместно с ДК без трансфекции и с трансфекцией плазмидой p5. В то же время группа с трансфекцией ДК плазмидой, кодирующей полноразмерный ген ErbB2, не показала значимого влияния на цитотоксический эффект в отношении клеточной линии MCF-7 (рис. 2).

Для проверки одного из возможных механизмов лизиса опухолевых клеток определялось содержание клеток, экспрессирующих внутриклеточный белок перфорин в культуре МНК здоровых доноров после сокультивирования с трансфицированными ДК. Было показано, что трансфекция ДК всеми типами целевых плазмид, содержащих антигенные детерминанты белка

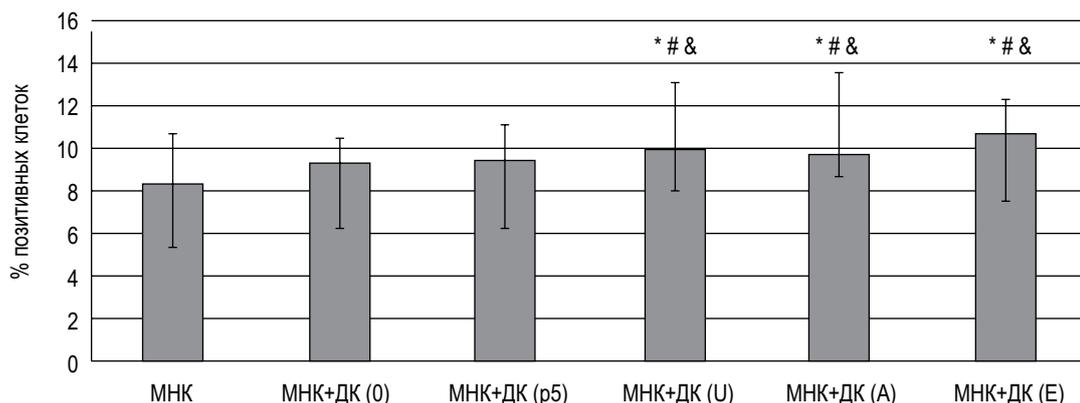


Рисунок 3. Содержание перфорин-позитивных клеток в совместной культуре МНК здоровых HLA-A02-позитивных доноров и аутологичных трансфицированных ДК (n = 10)

Примечание. Данные представлены в виде среднего и ошибки среднего.

* , # , & – статистически значимые различия с контрольными группами МНК, МНК+ ДК (0), МНК+ ДК (p5) соответственно.

HER-2, достоверно увеличивает цитотоксический потенциал культуры МНК через стимуляцию продукции перфориновых гранул (рис. 3).

Обсуждение

Использование трансфекции как одного из способов эффективной доставки антигенов в дендритные клетки для представления последних в комплексе с молекулами МНС является современным вариантом получения иммунотерапевтических вакцин для лечения онкологических заболеваний [10]. Создание полиэпитопных конструкций, содержащих не весь антиген, а только эпитопы, стимулирующие Th1 и цитотоксические клетки, представляется перспективным подходом для стимуляции клеточного иммунного ответа. Полиэпитопные конструкции могут содержать эпитопы из различных белковых антигенов и в то же время покрывать заданное разнообразие аллельных вариантов молекул МНС. Для увеличения иммуногенности и для оптимизации МНС I- или МНС II-зависимой презентации эпитопов в состав полиэпитопных конструкций могут быть включены различные сигнальные последовательности. Хотя иммуногенность пептидов определяется в основном его сходством к МНС, соседние аминокислотные остатки флангового эпитопа влияют на эффективность протеасомного высвобождения и ТАР-зависимую транспортировку в эндоплазматическую сеть [15]. Для усиления эффективности в дополнение к цитотоксическим Т-клеточным эпитопам антигенная конструкция должна содержать Т-хелперные эпитопы, которые были отобраны с использованием моделей прогнозирования ProPred [21]. Антигенные конструкции, обладающие N-концевой сигнальной последовательностью для направления в эндоплазматический ретикулум вместе с С-концевой

лизосомальной последовательностью, перенаправляющей ассоциированный иммуноген в лизосомы для деградации, где пептидные фрагменты могут связываться с рециркулирующими молекулами МНС II класса, являются гораздо более эффективными в индукции Т-хелперного иммунного ответа, чем аналогичные иммуногены, лишенные таких сигналов [7, 8]. Для введения генетических конструкций, кодирующих универсальные и специфичные для гаплотипа HLA-A0201 полиэпитопные иммуногены, в нашей работе использовали метод магнитной трансфекции, основанный на проникновении наночастиц магнита со связанной плазмидой в клетки под воздействием магнитного поля. Методами ник-трансляции и FLOW-FISH была показана высокая эффективность трансфекции (свыше 40%). В литературе приводятся данные о проведении трансфекции генетических конструкций как на стадии незрелых, так и на стадии зрелых дендритных клеток [6, 24]. В данной работе магнитная трансфекция осуществлялась на стадии зрелых дендритных клеток. Предполагается, что выраженные эффекты ДК, трансфицированных на стадии зрелых клеток, могут быть обусловлены тем, что сама трансфекция является транзиторной, и максимальный пик экспрессии целевых белков и их представления на клетках совпадает в клеточном протоколе с моментом взаимодействия ДК с аутологичными мононуклеарными клетками. Цитотоксические Т-клетки – главный компонент противоопухолевого иммунного ответа, поскольку они могут прямо лизировать клетки опухоли и секретировать иммуномодулирующие цитокины IL-2, TNF α , GM-CSF и IFN γ , которые оказывают опосредованное воздействие на злокачественные клетки. Клеточная линия MCF-7 представляет собой клетки аденокарциномы легкого молочной железы человека, несущей

щие поверхностные маркеры HLA-A0201 и HER2 которые должны узнаваться «обученными» мононуклеарными клетками. Проведенные эксперименты показали достоверное повышение цитотоксического индекса в отношении клеточной линии MCF-7 в группах с ДК трансфицированными универсальной плазмидой и специфичной для гаплотипа HLA-A0201, по сравнению с контрольными группами. Для ДК, трансфицированных плазмидой, кодирующей полноразмерный белок гена ErbB2, способность к стимуляции цитотоксического ответа сохраняется на уровне, соответствующем контрольным плазидам, что свидетельствует о неэффективности данной плазмиды в отношении стимуляции клеточной цитотоксичности. При исследовании уровня внутриклеточного белка перфорина, который вызывает образование пор в цитоплазматической мембране и приводит к лизису клеток мишеней, в культуре МНК здоровых доноров после сокультивирования с трансфицированными ДК было показано, что трансфекция ДК всеми типами целевых плазмид достоверно увеличивает цитотоксический потенциал культуры МНК через стимуляцию продукции перфориновых гранул. Возможно, что применение плазмиды, кодирующей

полноразмерный ген ErbB2, для трансфекции ДК частично стимулирует отдельные механизмы цитотоксичности, но не приводит к полной реализации цитолитической функции Т-лимфоцитов против опухолевых клеток.

Таким образом, в ходе проведенной работы были протестированы генетические конструкции BC-U и BC-A0201, кодирующие универсальный гаплотип HLA-A*0201-аллель-специфичные полиэпитопные иммуногены, содержащие антигенные детерминанты белка HER2. Полученные из моноцитов, трансфицированные ДК способны представлять антиген аутологичным мононуклеарным клеткам, после чего последние приобретают повышенный цитотоксический потенциал за счет накопления в цитоплазме гранул перфорина и непосредственно оказывают специфический цитотоксический эффект на клеточную линию, несущую на своей поверхности молекулы-мишени. Использование для трансфекции плазмиды, кодирующей полноразмерный белок ErbB2, представляется менее эффективным.

Работа поддержана ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 гг.» (Соглашение № 8265), грант Президента РФ № 16.120.11.3396-МК.

Список литературы / References

1. Антонец Д.В., Максюттов А.З. TEpredict: программное обеспечение для предсказания Т-клеточных эпитопов // Молекулярная биология. 2010. Т. 44, № 1. С. 130-139. [Antonets D.V., Maksyutov A.Z. TEpredict: программное обеспечение для предсказания Т-клеточных эпитопов [TEpredict: software for T-cell epitope prediction]. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2010, Vol. 44, no. 1, pp. 130-139].
2. Состояние онкологической помощи населению России в 2011 году / Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2012. 240 с. [Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2011 godu / Pod red. V.I. Chissova, V.V. Starinskogo, G.V. Petrovoy [Condition cancer care in Russia in 2011. Eds.: Chissov V.I., Starinskij V.V., Petrova G.V]. Moscow: FGBU «MNIIOI im. P.A. Gercena» Minzdravsocrazvitija Rossii, 2012. 240 p].
3. Baxevanis C.N., Sotiriadou N.N., Gritzapis A.D., Sotiropoulou P.A., Perez S.A., Cacoullos N.T., Papamichail M. Immunogenic HER-2/neu peptides as tumor vaccines *Cancer Immunol. Immunother.*, 2006, Vol. 55, no. 1, pp. 85-95.
4. Benavides L.C., Gates J.D., Carmichael M.G., Patil R., Holmes J.P., Hueman M.T., Mittendorf E.A., Craig D., Stojadinovic A., Ponniah S., Peoples G.E. The impact of HER2/neu expression level on response to the E75 vaccine: from U.S. Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02. *Clin Cancer Res.*, 2009, Vol. 15, no. 8, pp. 2895-2904.
5. Bendtsen J.D., Nielsen H., von Heijne G., Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.*, 2004, Vol. 340, no. 4, pp. 783-795.
6. Bonehill A., Heirman C., Tuyaeerts S., Michiels A., Breckpot K., Brasseur F., Zhang Y., Van Der Bruggen P., Thielemans K. Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, no. 11, pp. 6649-6657.
7. Bonini C., Lee S.P., Riddell S.R., Greenberg P.D. Targeting antigen in mature dendritic cells for simultaneous stimulation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 166, no. 8, pp. 5250-5257.
8. Fassnacht M., Lee J., Milazzo C., Boczkowski D., Su Z., Nair S., Gilboa E. Induction of CD4(+) and CD8(+) T-cell responses to the human stromal antigen, fibroblast activation protein: implication for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res.*, 2005, Vol. 11, no. 15, pp. 5566-5571.
9. Foley J., Nickerson N.K., Nam S., Allen K.T., Gilmore J.L., Nephew K.P., Riese D.J. EGFR signaling in breast cancer: bad to the bone. *Semin Cell Dev Biol.*, 2010, Vol. 21, no. 9, pp. 951-960.
10. Gattinoni L., Powell D.J., Rosenberg S.A., Restifo N.P. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, Vol. 6, no. 5, pp. 383-393.

11. Hsieh C.S., deRoos P., Honey K., Beers C., Rudensky A.Y. A role for cathepsin L and cathepsin S in peptide generation for MHC class II presentation. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, no. 6, pp. 2618-2625.
12. Jarnjak-Jankovic S., Hammerstad H., Saebøe-Larssen S., Kvalheim G., Gaudernack G. A full scale comparative study of methods for generation of functional Dendritic cells for use as cancer vaccines. *BMC Cancer*, 2007, Vol. 7, p. 119.
13. Kamangar F., Dores G.M., Anderson W.F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J. Clin. Oncol.*, 2006, Vol. 24, no. 14, pp. 2137-2150.
14. Kato M., Neil T.K., Fearnley D.B., McLellan A.D., Vuckovic S., Hart D.N. Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cell. *Int. Immunol.*, 2000, Vol. 11, pp. 1511-1519.
15. Livingston B.D., Newman M., Crimi C., McKinney D., Chesnut R., Sette A. Optimization of epitope processing enhances immunogenicity of multiepitope DNA vaccines. *Vaccine*, 2001, Vol. 19, no. 32, pp. 4652-4660.
16. Lundegaard C., Lamberth K., Harndahl M., Buus S., Lund O., Nielsen M. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nucleic Acids Res.*, 2008, Vol. 36, pp. 509-512.
17. Obermaier B., Dauer M., Herten J., Schad K., Endres S., Eigler A. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol. Proced. Online*, 2003, Vol. 5, pp. 197-203.
18. Peters B., Bulik S., Tampe R., Van Ender P.M., Holzhütter H.G. Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 4, pp. 1741-1749.
19. Ross J.S., Slodkowska E.A., Symmans W.F., Pusztai L., Ravdin P.M., Hortobagyi G.N. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist.*, 2009, Vol. 14, no. 4, pp. 320-368.
20. Rufer N., Brümendorf T.H., Kolvraa S., Bischoff C., Christensen K., Wadsworth L., Schulzer M., Lansdorp P.M. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J. Exp. Med.*, 1999, Vol. 190, no. 2, pp. 157-167.
21. Singh H., Raghava G.P. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics.*, 2001, Vol. 17, no. 12, pp. 1236-1237.
22. Tanaka F., Yamaguchi H., Haraguchi N., Mashino K., Ohta M., Inoue H., Mori M. Efficient induction of specific cytotoxic T lymphocytes to tumor rejection peptide using functional matured 2 day-cultured dendritic cells derived from human monocytes. *Int. J. Oncol.*, 2006, Vol. 29, no. 5, pp. 1263-1268.
23. Toes R.E., Nussbaum A.K., Degermann S., Schirle M., Emmerich N.P., Kraft M., Laplace C., Zwinderman A., Dick T.P., Müller J., Schönfish B., Schmid C., Fehling H.J., Stevanovic S., Rammensee H.G., Schild H. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.*, 2001, Vol. 194, no. 1, pp. 1-12.
24. Tuyaerts S., Aerts J.L., Corthals J., Neyns B., Heirman C., Breckpot K., Thielemans K., Bonehill A. Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.*, 2007, Vol. 56, no. 10, pp. 1513-1537.
25. Zhang T., Maekawa Y., Hanba J., Dainichi T., Nashed B.F., Hisaeda H., Sakai T., Asao T., Himeno K., Good R.A., Katunuma N. Lysosomal cathepsin B plays an important role in antigen processing, while cathepsin D is involved in degradation of the invariant chain in ovalbumin-immunized mice. *Immunology*, 2000, Vol. 100, no. 1, pp. 13-20.

Medical Immunology/ Meditsinskaya Immunologiya
2014, Vol. 16, No 5, pp. 417-424

ORIGINAL ARTICLES

EFFICIENCY STUDIES OF INDUCED CYTOTOXIC IMMUNE RESPONSE OF MONONUCLEAR CELLS BY MEANS OF DENDRITIC CELLS TRANSFECTED BY POLYEPITOPIC HER2/ERBB2 CONSTRUCTS

Maksyutov A.Z., Lopatnikova Yu.A., Kurilin V.V., Shevchenko Yu.A.,
Khantakova Yu.N., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Peregudov A.G., Zaytsev S.A.,
Kozlov V.A., Sennikov S.V.

Research Institute Of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch,
Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. This study describes a design of genetic constructs encoding either non-specific, or HLA-A*0201-specific polyepitopic immunogens containing antigenic determinants for HER2 protein. We have shown that transfection of mature dendritic cells by polyepitopic constructs with magnetic nanoparticles

lead to effective in vitro stimulation of cytotoxic immune response of mononuclear cell populations obtained from HLA-A0201-positive healthy donors/ This cytotoxic action was assessed in vitro, as lethal effects upon HLA-A0201/HER2 double positive MCF-7 tumor cells, and expression of perforin granules. (*Med. Immunol.*, 2014, vol. 16, N 5, pp 417-424)

Keywords: cytotoxicity, polyepitopic constructs, dendritic cells, transfection

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2014-5-417-424>

Authors:

Maksyutov A.Z., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute Of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Lopatnikova Yu.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute Of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Kurilin V.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute Of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Shevchenko Yu.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute Of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Khantakova Yu.N., Graduate Student, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute Of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Gavrilova E.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute Of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Maksyutov R.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute Of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Peregudov A.G., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute Of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Zaytsev S.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute Of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member of Russian Academy of Sciences, Director, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Sennikov S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute Of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation

Address for correspondence:

Sennikov Sergey V.

PhD, MD, Professor, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute Of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch

630099, Russian Federation, Novosibirsk, Yadrinsevska str., 14, office 301-309.

Phone: 7 (383) 222-19-10.

E-mail: sennikov_sv@mail.ru

Received 15.10.2013

Accepted 21.11.2013