

На правах рукописи

Данилевский Михаил Игоревич

**Использование rhHsp70 для регуляции активности
иммунокомпетентных клеток.**

03.00.04 – биохимия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2009

Работа выполнена на кафедре биологической химии лечебного факультета
ГОУ ВПО Московской Медицинской Академии им. И.М. Сеченова

Научный руководитель

член-корр. РАМН, доктор
химических наук, профессор
Северин Сергей Евгеньевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор
Глухов Александр Иванович

доктор биологических наук,
профессор
Колесанова Екатерина Федоровна

Ведущая организация

Учреждение Российской академии
наук Институт биоорганической
химии им. академиков М. М.
Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

Защита состоится "22" октября 2009 г. в 13 часов на заседании
Диссертационного совета Д 001.010.01. при Учреждении Российской академии
медицинских наук Научно-исследовательском институте биомедицинской
химии имени В.Н.Ореховича РАМН по адресу: 119121, Москва, ул.
Погодинская, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ РАМН.

Автореферат разослан " ____ " _____ 2009 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат химических наук

Е.А. Карпова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы. Многие формы онкологических заболеваний до сих пор трудно поддаются современным методам терапии, основанным на хирургическом вмешательстве, использовании химиотерапии и лучевой терапии. Поэтому наряду с совершенствованием классических методов крайне актуальными являются исследования, направленные на создание новых стратегий борьбы с раком с помощью иммунотерапии, целью которых является как предупреждение развития опухолей, так и их элиминация, в частности, с использованием белков теплового шока (БТШ, Hsp) для специфической активации иммунной системы.

В 1980-х годах в экспериментах Р. К. Srivastava и соавторов была обнаружена способность выделенных из опухолевых тканей БТШ разных семейств - Hsp70, gp96, Hsp90 - индуцировать клеточный противоопухолевый иммунный ответ (Srivastava P. K. et al., 1998; Usono H. et al., 1994). Имуногенность таких препаратов определяется присутствием в их составе опухолеспецифических антигенов (ОСА) или их фрагментов – опухолеспецифических пептидов (ОСП) - в виде прочно связанных комплексов с БТШ (Suto R. et al., 1995; Srivastava P. K. et al., 1998; Przepiorka D. et al., 1998; Ishii T. et al., 1999). Это открытие стимулировало исследования, направленные на создание реконструированных противоопухолевых вакцин на основе рекомбинантных белков Hsp70 и gp96 в виде комплексов с ОСА, в том числе с синтетическими МНС-рестриктированными ОСП, или в виде фьюжен-белков БТШ с ОСА, или в виде ДНК-вакцин, содержащих гены БТШ и ОСА (Blachere N.E. et al, 1997; Li Z et al., 2004; Wang X.Y. et al, 2005; Zhang X. et al , 2007).

Высокая иммуногенность комплексов ОСА с нативными и рекомбинантными Hsp70 и gp96 обусловлена способностью этих БТШ транспортировать ОСА в важнейшие антигенпредставляющие клетки организма - в дендритные клетки (ДК) (Arnold-Schild D. et al., 1999; Noessner N. et al., 2002). В результате процессинга экзогенных антигенов в ДК образуются как пептиды, которые могут встраиваться в молекулы МНС класса II, так и

пептиды, которые могут встраиваться в молекулы МНС I, презентироваться в контексте этих молекул Т-лимфоцитам и распознаваться Т-клеточным рецептором CD4+ и CD8+ цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ) соответственно. Полагают, что БТШ оптимизируют этот процесс, обеспечивая транспорт ОСП через внутриклеточные мембраны в те везикулы клетки, где происходит формирование комплексов пептидов с белками МНС I и II.

Кроме того, показано, что многие БТШ обладают иммунорегуляторной активностью и стимулируют созревание незрелых ДК и секрецию ДК цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО α и ИЛ-12, которые обеспечивают и поддерживают индукцию и пролиферацию антигенспецифических, в том числе, опухолеспецифических ЦТЛ (Kupfner M.C. et al., 2001; Asea A. et al., 2002, 2005). Однако, сведения об иммунорегуляторной активности БТШ весьма противоречивы. Важно отметить, что при исследовании даже высоко очищенных от эндотоксинов нативных и рекомбинантных эукариотических БТШ одни авторы обнаруживают у Hsp70 способность ускорять созревание ДК и активировать их функции (Asea A., 2005, 2007; Tsan M.F. et al., 2004), в то время как другие не находят у этого белка свойств цитокина и показывают, что его способность усиливать презентацию антигенов целиком определяется влиянием Hsp70 на внутриклеточную доставку пептидов при использовании антигенов в виде комплексов с Hsp70 (Bausinger H. et al., 2002; Bendz H. et al., 2007). Разногласия в оценке иммунорегуляторной активности БТШ могут зависеть как от особенностей использованных препаратов Hsp70, так и от выбранных клеточных моделей.

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение влияния рекомбинантного белка Hsp70A1В человека (rhHsp70) на активность ДК человека разной стадии созревания и возможности оптимизации противоопухолевого клеточного иммунного ответа при использовании реконструированных комплексов Hsp70 с ОСА.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Выделение и очистка rhHsp70A1B из бактериальной массы штамма клеток *E.coli*, трансформированных экспрессионной плазмидой pQE80-hHSP70A1B, конструкция которой содержит полноразмерную последовательность гена HSP70A1B.
2. Характеристика полученного белка по молекулярной массе и иммунохимической активности с помощью электрофореза в ПААГе и иммуноблоттинга.
3. Исследование влияния rhHsp70 на активность НК-клеток, уровень секреции ФНО α незрелыми ДК (нзДК) и зрелыми ДК (зрДК) и способность ДК разной степени зрелости стимулировать пролиферацию и цитотоксическую активность (ЦТА) лимфоцитов.
4. Исследование возможности оптимизации индукции опухолеспецифических ЦТЛ при использовании комплексов ОСП MelanA/Mart с rhHsp70.
5. Исследование возможности оптимизации индукции опухолеспецифических ЦТЛ при использовании комплексов ОСА лизатов опухолевых клеток с rhHsp70.

Научная новизна работы.

Впервые обнаружено, что выделенный и очищенный из штамма-продуцента *E.coli* рекомбинантный белок теплового шока человека rhHsp70A1B по иммунохимическим свойствам отличается от rhHsc70 и rHsp70 *M. tuberculosis*, несмотря на высокую степень гомологии этих белков.

Впервые обнаружено, что rhHsp70A1B стимулирует секрецию ФНО α и повышает способность дендритных клеток стимулировать спонтанную ЦТА лимфоцитов только при действии на зрелые дендритные клетки.

Впервые показано, что введение комплексов опухолеспецифических антигенов с Hsp70 в ДК можно проводить в присутствии АДФ и Mg²⁺, что обеспечивает стабильность этих комплексов.

Впервые обнаружено, что использование различных опухолеспецифических антигенов при нагрузке зрелых ДК в форме комплексов с rhHsp70A1B позволяет индуцировать ЦТЛ с более высокой специфической цитотоксической активностью, чем при использовании свободных антигенов.

Практическая значимость исследования.

Обнаружено, что выделенный и очищенный из штамма-продуцента *E.coli* рекомбинантный белок теплового шока человека rhHsp70A1B обладает иммунорегулирующей активностью, но при этом оказывает разные эффекты на ДК человека на разных стадиях их дифференцировки: ускоряет созревание незрелых ДК и повышает их антигенпредставляющую способность, но активирует только зрелые ДК, стимулируя секрецию ФНО α и повышая их способность стимулировать ЦТА лимфоцитов, что необходимо учитывать, при создании вакцин на основе этого белка.

Обнаруженная возможность проводить введение комплексов антигенов с Hsp70 в ДК в присутствии комплексообразующих агентов АДФ и Mg²⁺ упрощает и делает более стабильной процедуру введения антигенов в ДК.

Продемонстрированная в работе оптимизация индукции клеточного иммунного ответа при стимуляции лимфоцитов ДК, в которые опухолеспецифические антигены вводили в виде комплексов с rhHsp70A1B позволяет рекомендовать этот белок для разработки реконструированных вакцин и для оптимизации приготовления ДК-вакцин.

Апробация работы. Результаты исследований были доложены на Российском Медицинском Форуме-2006 «Фундаментальная наука и практика» (2006, Москва), на International Scientific-Practical Interdisciplinary Workshop “New Technologies in Medicine and Experimental Biology” (2007, Bangkok-Pattaya, Thailand), на Международной конференции "Физиология и патология иммунной системы" и IV Международной конференции по иммунотерапии (2008 г., Москва), на XII Онкологическом конгрессе (2008 г., Москва), на Иммунологическом форуме с международным участием (2008 г., Санкт-Петербург).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ: 3 статьи, опубликованные в журналах, состоящих в перечне ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК, и 5 публикаций, представленных в материалах конференций.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 110 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы и список цитированной литературы, включающий 142 источника. Работа иллюстрирована 21 рисунком и 1 таблицей.

Материалы и методы

1. Получение и очистка рекомбинантного Hsp70A1B человека. Белок Hsp70A1B получали из штамма-продуцента *E.coli* JM109, трансфицированного плазмидой pQE80-HSP70A1B с помощью металл-хелатной хроматографии. Чистоту полученного препарата оценивали по данным электрофореза в 12% ПААГе в восстанавливающих условиях с последующим окрашиванием Coomassie Brilliant Blue R-250 (“Sigma”, США). Иммуноблоттинг белков rhHsp70, rhHsc70 и rHsp70 *M. tuberculosis* проводили по стандартному протоколу с использованием МоАТ к Hsp70 клона 3A3 (HyTest). Содержание примеси ЛПС в препарате rhHsp70 определяли с помощью ЛАЛ-теста (Charls Rivers Endosafe Inc.) в соответствии с прописью фирмы-изготовителя.

2. Получение ФИТЦ-производных препаратов. ФИТЦ-меченные препараты rhHsp70 и пептида из коровой области вируса гепатита С HCV₂ (YLLPRRGPRRL) получали при их инкубации с раствором ФИТЦ в карбонатном буфере. ФИТЦ-меченый rhHsp70 очищали на колонке с сефадексом G50. Очистку ФИТЦ-меченного пептида осуществляли с использованием ВЭЖХ на колонке Delta-Pack 300 C₁₈. Детекцию проводили по поглощению в области 495 нм. Собирали фракцию со временем выхода 12,6 мин, замораживали и хранили при -70°C.

3. Культивирование клеток. Клетки Т-В-клеточной гибридомы линии Т2 культивировали в пластиковых флаконах (“Costar”, США) в среде RPMI 1640 (“Sigma”, США) с добавлением 10% сыворотки плодов крупного рогатого скота (СПК, “Gibco”, США), 50 мкг/мл гентамицина; клетки аденокарциномы предстательной железы человека линии Du145 – аналогично, но в среде DMEM; клетки аденокарциномы предстательной железы человека линии LNCaP – в смеси сред RPMI 1640 (“Sigma”, США) и DMEM (“Sigma”, США) (1:1), с добавлением 10% СПК и 5% сыворотки лошади (“Gibco”, США), 50 мкг/мл гентамицина, в увлажненной среде при температуре 37⁰С в CO₂-инкубаторе при содержании CO₂ 5%.

4. Получение дендритных клеток человека. НзДК получали из моноцитов периферической крови человека с использованием цитокинов ГМ-КСФ (предоставлен к.б.н. Л.Е. Петровской, Институт биоорганической химии им.М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова) и ИЛ-4 (препарат ГУЗ“МНИИМЭ”). ЗрДК – при культивировании нзДК в течение 3 суток в присутствии ФНО α (50 нг/мл) и простагландина E2 (1 мкг/мл).

5. Анализ фенотипа ДК. Фенотип ДК исследовали с использованием ФИТЦ-меченных антител к антигенам CD80, CD83, CD86 (“PharMingen”, США) при помощи проточного цитофлуориметра EPICS-XL (“Coulter Electronics”, США).

6. Определение уровня связывания и накопления ФИТЦ-меченного препарата rhHsp70 и пептида HCV₂ проводили с помощью соответствующих ФИТЦ-меченных производных на приборе EPICS-XL (“Coulter Electronics”, США).

7. Определение антигенпредставляющей способности (АПС) ДК. АПС ДК оценивали по уровню стимуляции пролиферации аллогенных Т-лимфоцитов с использованием ³H-тимидина, который добавляли в культуральную среду на последние 18 часов культивирования. Уровень радиоактивности измеряли с помощью жидкостного сцинтилляционного

счетчика (LKB RakBeta). Интенсивность биосинтеза ДНК оценивали в импульсах/минуту.

8. Получение комплексов rhHsp70 с опухолеспецифическими и вирусспецифическими антигенами проводили, смешивая rhHsp70 с пептидами или смесью лизатов (LNCaP и Du145 в массовом соотношении 1:1), полученных путем проведения трех циклов замораживание (жидкий азот) - оттаивание (водяная баня, 37⁰C) клеток. При этом массовое соотношение rhHsp70 : антиген составляло в случае пептидов 1:1, а в случае лизатов – 1:2,5, с таким расчетом, чтобы конечная концентрация rhHsp70 при добавлении комплексов к культурам клеток составляла 20 мкг/мл. Далее смесь инкубировали в буферном растворе при +37⁰ C в течение 60 минут, а затем вносили АДФ (“Sigma”, США) и MgCl₂ до конечных концентраций 0,5 мМ и 2 мМ соответственно и продолжали инкубацию еще 60 минут. Конечный объем смеси составлял 1/15 от объема среды в культурах.

9. Обработку ДК rhHsp70, пептидами, ОСА лизатов опухолевых клеток и комплексами rhHsp70 с антигенами проводили в присутствии полимиксина В (Sigma) (50 мкг/мл) для исключения влияния возможных примесей ЛПС. ДК собирали, ресуспендировали в свежей ПКС с цитокинами, добавляли к ним rhHsp70 в концентрации 20 мкг/мл и инкубировали на протяжении 4 или 18 часов в обычных условиях культивирования. Для нагрузки ДК комплексом rhHsp70+антигены ДК собирали, отмывали в бессывороточной среде RPMI 1640, ресуспендировали в среде AIM-V (“Gibco”, США) и добавляли к ним комплекс rhHsp70+антигены. Инкубация с антигенами проводилась в CO₂-инкубаторе на протяжении 4 часов в случае комплексов, полученных с использованием пептидов, или с пептидами и 18 часов в случае комплексов, полученных с использованием лизатов, или с лизатами опухолевых клеток (LNCaP и Du145 в соотношении 1:1, концентрация белка лизата 60 мкг/мл).

10. Индукция антигенспецифических ЦТЛ. Контрольные и нагруженные антигенами ДК смешивали с аутологическими лимфоцитами в

соотношении 1:10. Индукцию ЦТЛ проводили в 24-луночном планшете ("Corning", США), каждая лунка содержала $2,5 \cdot 10^5$ ДК и $2,5 \cdot 10^6$ лимфоцитов в 1 мл среды. На следующий день после стимуляции и далее два раза в неделю к клеткам добавляли 30 ед/мл ИЛ-2 ("Sigma", США). На восьмой день проводили рестимуляцию лимфоцитов ДК, нагруженными соответствующими антигенами в описанных выше условиях. На 7 день после рестимуляции лимфоциты собирали, отмывали и использовали для определения цитотоксической активности (ЦТА) в отношении различных клеток мишеней.

11. Определение цитотоксической активности ЦТЛ с использованием хрома-51. ЦТА в отношении клеток Т-В-клеточной гибридомы человека линии Т2 или карциномы предстательной железы линии LNCaP определяли в цитотоксическом тесте с использованием хрома-51. Для этого клетки-мишени линии Т2 и LNCaP инкубировали в 100 мкл среды с хромом-51 (150 мкКи) в течение 1 часа. Часть клеток Т2 в течение 1 часа нагружали пептидом для получения пептидспецифических клеток-мишеней. Затем клетки-мишени отмывали и добавляли в круглодонный 96-луночный планшет по 5 тысяч клеток на лунку к антигенспецифическим ЦТЛ, которые предварительно вносили в планшет в количестве 25-200 тысяч клеток на лунку. Соотношение клетки-мишени: клетки-эффекторы составляло от 1:5 до 1:40. Через 4 ч инкубации платы центрифугировали и по 100 мкл надосадочной жидкости собирали во флаконы для измерения радиоактивности на сцинтилляционном счетчике RackBeta ("ЛКВ", Швеция). ЦТА лимфоцитов рассчитывали по формуле: $ЦТА = \frac{РА_{опыт} - РА_{спонтанный\ выход}}{РА_{(максимальный\ выход - спонтанный\ выход)}} \times 100\%$, где $РА_{(опыт)}$ и $РА_{(спонтанный\ выход)}$ – радиоактивность проб, где инкубировались опухолевые клетки-мишени с клетками-эффекторами или только клетки-мишени соответственно.

12. Определение концентрации цитокинов. Концентрацию ИФ γ и ФНО α в культуральной среде, собранной через 24 часа после рестимуляции лимфоцитов ДК, определяли с помощью ИФА в соответствии с прописью производителя.

13. Статистическая обработка результатов проводилась по методу Стьюдента с помощью компьютерной обработки данных в программе Microcal Origin 5,0.

Результаты и обсуждение.

1. Характеристика чистоты и иммунохимических свойств препарата **rhHsp70A1B**. После индукции экспрессии гена rhHsp70 в клетках *E.coli* целевой белок в равной степени накапливается как в растворимой фракции цитоплазмы, так и в виде телец включения, что отличает данный штамм от описанных ранее систем экспрессии Hsp70, где основная масса (95%) рекомбинантного белка нарабатывалась в *E.coli* в виде нерастворимых телец

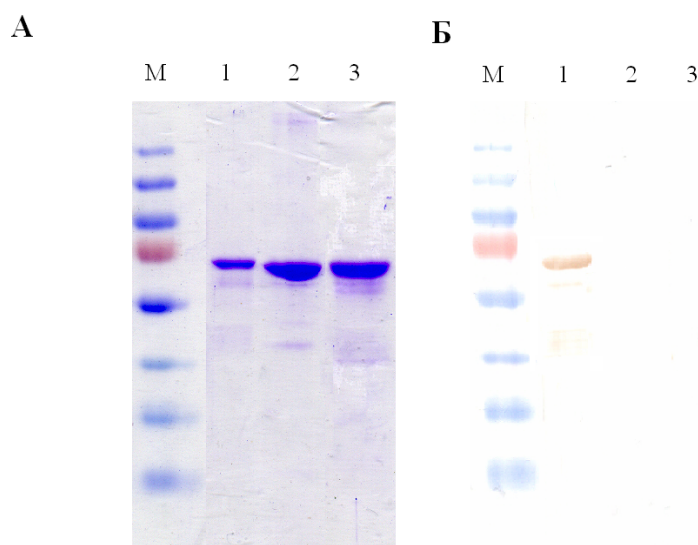


Рис. 1. Электрофореграмма (А) и иммуноблот (Б) препаратов Hsp70.

М – белковые маркеры молекулярной массы;

1 – rhHsp70A1B;

2 – rHsp70 *M. tuberculosis*;

3 – rhHsc70.

включения. Использование белка, содержащегося в тельцах включения, требует предварительной процедуры рефолдинга, не всегда приводящей к формированию нативной структуры, поэтому мы работали с белком, полученным из растворимой фракции. Процедура очистки с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25 и аффинной хроматографии с использованием иминодиацетат-сефарозы, активированной ионами никеля, позволяет получить белок, чистота которого по данным электрофореза в ПААГе в присутствии β -меркаптоэтанола составляет не менее 99% (рис. 1А). При исследовании иммунохимических свойств полученного белка rhHsp70 и белков rhHsc70 и rHsp70 *M. tuberculosis* с помощью иммуноблоттинга специфическое окрашивание белковой полосы МоАТ к Hsp70 обнаружено

только в случае rhHsp70, что свидетельствует о существовании особенностей в строении этих белков, несмотря на высокую степень консервативности. По результатам ЛАЛ-теста содержание эндотоксина в полученных нами препаратах составляло от 150 до 480 нг ЛПС на 1 мг белка rhHsp70. В связи с этим все эксперименты проводили с использованием полимиксина В, связывающего ЛПС.

2. Исследование способности rhHsp70A1B связываться и эндоцитироваться дендритными клетками разной степени зрелости. На следующем этапе исследования была изучена способность ДК связывать и эндоцитировать rhHsp70 и специфичность связывания rhHsp70 с ДК. Полученные результаты представлены на Рис. 2 и из них следует, что rhHsp70 при инкубации с ДК при +4 °С связывается с этими клетками (Рис. 2А, кривая 2),

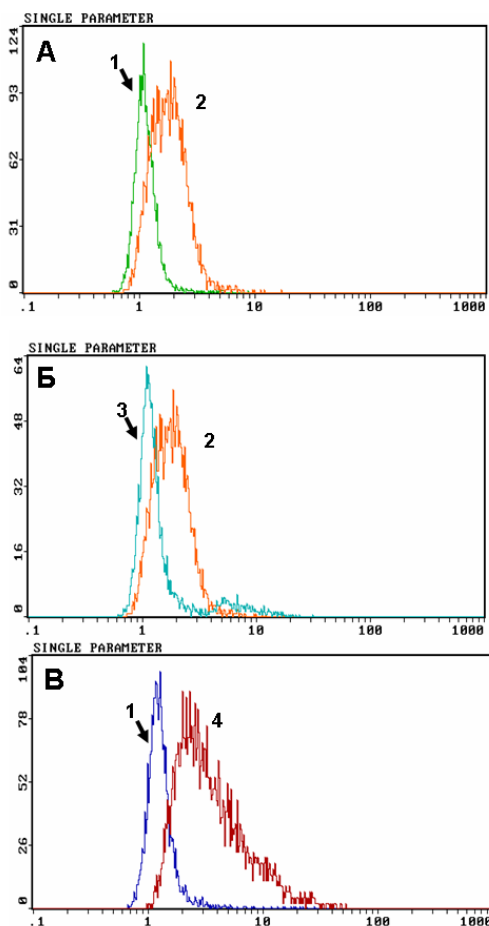


Рис. 2. Связывание и эндоцитоз меченного ФИТЦ rhHsp70 дендритными клетками.
А – связывание ФИТЦ-rhHsp70 (20 мкг/мл) при +4°C (2);
Б – связывание ФИТЦ-rhHsp70 при +4°C (2) и в присутствии 5-и кратного избытка немеченого rhHsp70 (3);
В – эндоцитоз ФИТЦ-rhHsp70 при +37°C (4); А-В - 1 – аутофлуоресценция клеток.

и что связывание носит специфический характер, т.к. предварительная инкубации ДК в присутствии 100 мкг/мл немеченого rhHsp70 полностью блокирует связывание меченного ФИТЦ rhHsp70 с ДК (Рис.2Б, кривая 3 по

сравнению с кривой 2). При инкубации ДК с меченым ФИТЦ rhHsp70 при +37 °С обнаружено значительно более высокое накопление красителя в ДК, чем при исследовании связывания при +4 °С (Рис.2 В, кривая 4 по сравнению с Рис.2А, кривая2) , что свидетельствует об интенсивном эндоцитозе этого белка ДК.

3. Исследование влияния rhHsp70A1B на созревание ДК. Для исследования влияния rhHsp70 на созревание ДК этот белок смешивали с полимиксином В для инактивации незначительной примеси ЛПС в препаратах

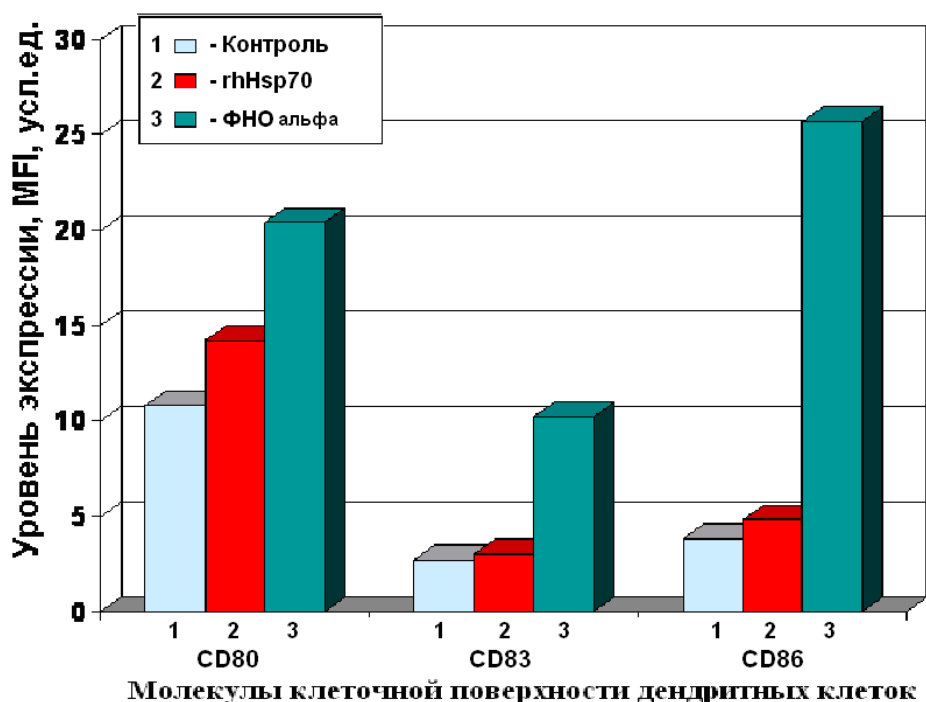


Рис.3. Влияние rhHsp70 на созревание ДК. Представлены данные одного из трех типичных экспериментов.

и спустя 30 мин добавляли к культуре ДК в концентрации 20 мкг/мл. Для получения контрольных зрДК в качестве факторов созревания использовали ФНО α (50 нг/мл) и препарат лейкинферон (100 МЕ/мл), содержащий ИФ α и смесь цитокинов. Полученные результаты представлены на Рис.3. Оказалось, что при действии Hsp70 на ДК спустя 48 часов после добавления белка отмечается небольшое увеличение экспрессии молекул CD80 и CD86: возрастает средняя интенсивность флуоресценции клеток (MFI) на 2-4 усл. ед. (Рис.3) и на 5-10% возрастает количество ДК, экспрессирующих эти маркеры. Увеличение экспрессии маркеров созревания при инкубации ДК с ФНО α и

лейкинфероном было в несколько раз выше, чем при инкубации с rhHsp70, и, тем не менее, полученные результаты свидетельствуют об ускорении созревания ДК в присутствии Hsp70.

4. Изучение влияния белка rhHsp70 на уровень секреции ФНО α дендритными клетками человека. Для изучения влияния белка rhHsp70 на способность ДК секретировать ФНО α rhHsp70 в концентрации 20 мкг/мл добавляли к незДК и к зрДК в полной культуральной среде и продолжали культивирование в течение 24 часов. После этого культуральную среду собирали для исследования содержания ФНО α с помощью ИФА.

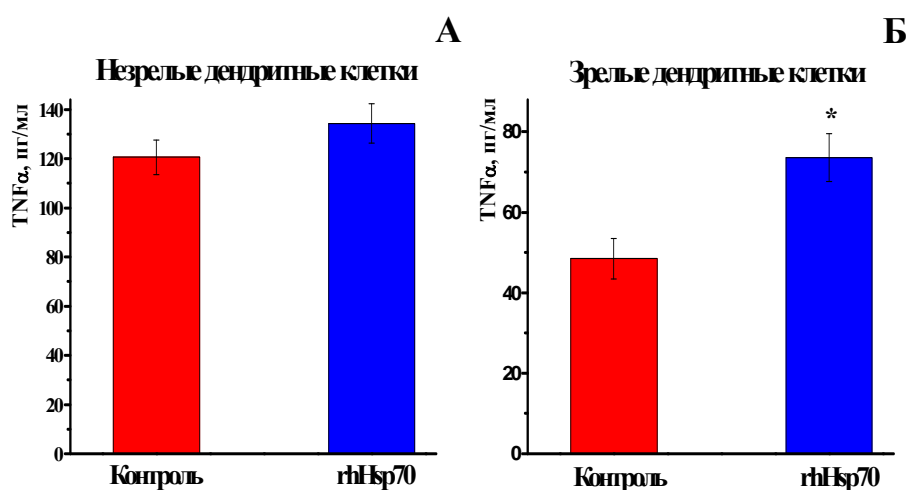


Рис.4. Влияние белка rhHsp70 на уровень секреции ФНО α незрелыми (А) и зрелыми (Б) дендритными клетками.

Полученные результаты представлены на Рис.4. Показано, что после культивирования rhHsp70 с незДК не обнаружено значимых изменений в концентрации ФНО α , а после культивирования со зрДК она возростала на 52%. Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что rhHsp70 повышает секрецию клетками ФНО α только при действии на зрДК.

5. Изучение влияния rhHsp70 на антигенпредставляющую способность ДК. Для исследования влияния rhHsp70 на активность ДК анализировали его влияние на антигенпредставляющую способность незДК. Для этого ДК, собранные на шестые сутки культивирования инкубировали с rhHsp70 в течение 18 часов. Затем ДК рассаживали в 96-ти луночные планшеты в количестве 0-10000 клеток на лунку в 100 мкл среды и к ним вносили аллогенные лимфоциты (200 тысяч/лунку в 100 мкл среды). Смешанные

культуры инкубировали 5 суток в обычных условиях культивирования и по включению ^3H -тимидина, оценивали уровень стимуляции пролиферации

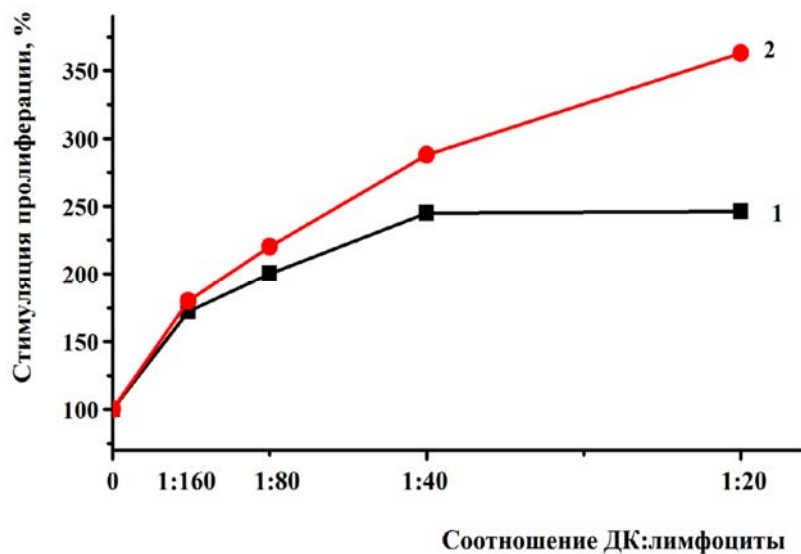


Рис.5. Влияние rhHsp70 на антигенпредставляющую активность ДК человека. 1 – контрольные ДК;

2 – ДК после культивирования в течение 18 часов с rhHsp70.

лимфоцитов контрольными ДК и ДК, обработанными rhHsp70. Представленные на Рис.5 результаты показывают, что предварительная инкубация нзДК с rhHsp70 в течение 18 часов приводила к более интенсивной стимуляции пролиферации аллогенных лимфоцитов, чем при их стимуляции контрольными ДК. Таким образом, обработка ДК rhHsp70 приводит к повышению их антигенпредставляющей способности.

6. Изучение влияния белка rhHsp70 на способность дендритных клеток человека стимулировать неспецифическую ЦТА лимфоцитов. Для изучения влияния rhHsp70 на способность ДК разной стадии дифференцировки влиять на уровень спонтанной ЦТА лимфоцитов нами были использованы клетки-мишени линии Т2. Полученные результаты представлены на Рис.6. Из них видно, что при обработке зрДК в течение 4 часов белком rhHsp70 наблюдалось небольшое повышение их способности стимулировать спонтанную ЦТА в отношении клеток Т2 (Рис. 6Б, кривая 2). Обработка нзДК rhHsp70 не оказывала значительного влияния на уровень неспецифической ЦТА в отношении клеток-мишеней Т2. Аналогичные данные получены в отношении клеток Т2, обработанных пептидом, и в отношении клеток линии

LnCaP. Таким образом, rhHsp70 только при действии на зрДК повышает их способность к стимуляции спонтанной ЦТА лимфоцитов.

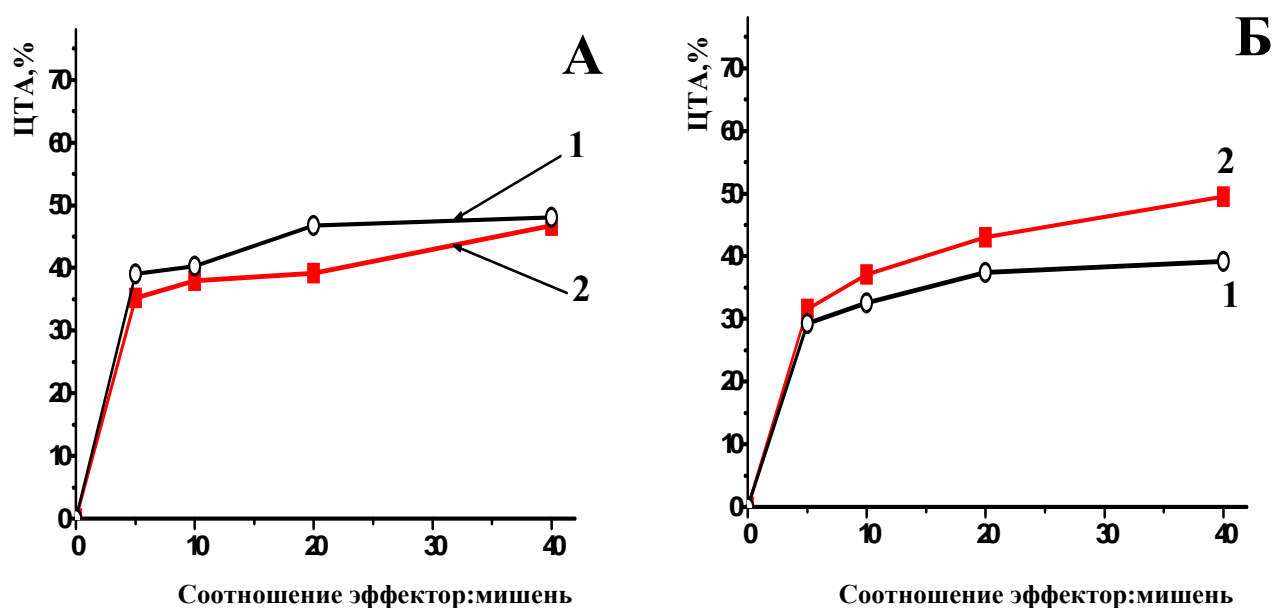


Рис.6. Влияние обработки ДК белком rhHsp70 на уровень ЦТА индуцированных лимфоцитов. А – незрелые ДК; Б – зрелые ДК; 1 – контрольные ДК; 2 – ДК, обработанные rhHsp70.

Резюмируя полученные результаты можно заключить, что rhHsp70 специфически связывается и эндоцитируется ДК человека. Взаимодействие rhHsp70 с незДК приводит к стимуляции их созревания, повышению антигенпредставляющей активности. Взаимодействие rhHsp70 со зрДК приводит к увеличению уровня секреции ФНО α зрелыми ДК. При культивировании зрДК, обработанных предварительно rhHsp70, обнаружено повышение ЦТА стимулированных ими лимфоцитов.

Таким образом, в условиях, исключающих действие возможной примеси ЛПС благодаря использованию полимиксина В, обнаружено, что rhHsp70A1В обладает иммунорегулирующей активностью.

7. Изучение влияния белка rhHsp70 на активность естественных киллеров. Hsp70 может оказывать влияние на систему врожденного иммунитета, регулируя активность естественных киллеров (NK-клеток). Целью данного раздела работы явилось исследование влияния rhHsp70 на активность

НК-клеток. Для этого с помощью проточной цитофлуориметрии исследовали содержание гранзима В – одного из белков, определяющих механизм цитолитического действия НК-клеток на клетки-мишени. Для этого мононуклеарные лимфоциты, выделенные из периферической крови в течение 24 часов, инкубировали в присутствии ИЛ-2 для активации НК-клеток, а затем

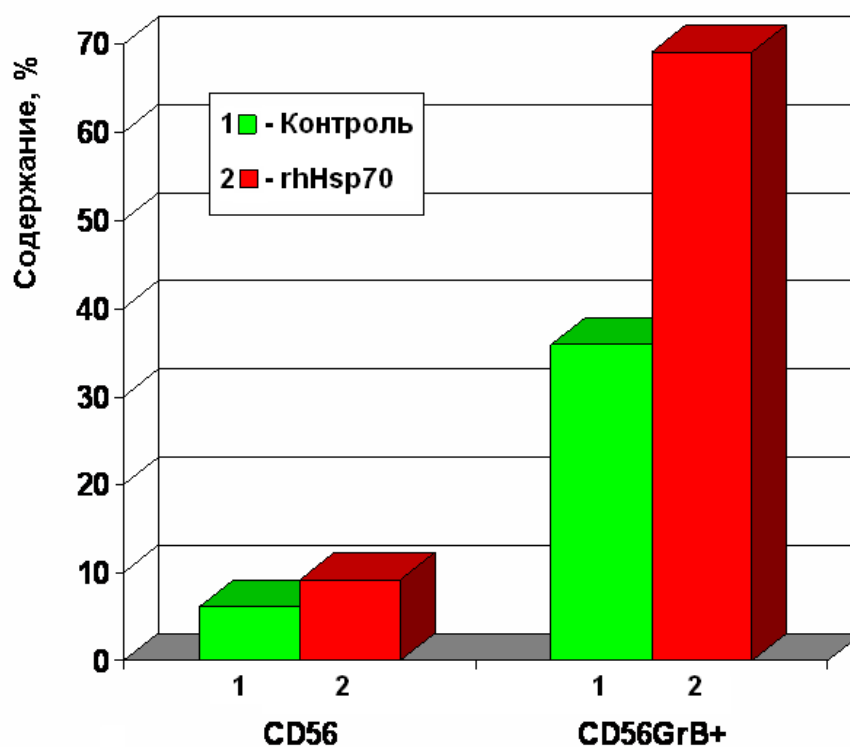


Рис. 7. Активация НК-клеток при культивировании лимфоцитов в присутствии rhHsp70.

на 48 часов вносили препарат rhHsp70. После окончания инкубации проводили окрашивание клеток мечеными фикоэритрином антителами к CD56, специфически связывающимися с НК-клетками. Затем клетки фиксировали и проводили реакции внутриклеточного окрашивания клеток мечеными ФИТЦ антителами к гранзиму В. Показано, что внесение препаратов rhHsp70 к мононуклеарным лейкоцитам приводило к увеличению количества НК-клеток, и, кроме того, под влиянием rhHsp70 происходило повышение доли НК-клеток, содержащих гранзим В (Рис.7), что свидетельствует об усилении их цитолитической активности. Таким образом, использование препаратов rhHsp70 повышает функциональную активность НК-клеток, что может иметь

большое значение при создании вакцин на основе препарата рекомбинантного rhHsp70.

8. Влияние обработки ДК комплексом rhHsp70 с опухолеспецифическим пептидом на антигенспецифическую ЦТА индуцированных лимфоцитов. Специфическую ЦТА лимфоцитов индуцировали с помощью ДК, нагруженных пептидом MelanA/Mart или комплексом rhHsp70-пептид, контролем служили необработанные ДК (Рис.8).

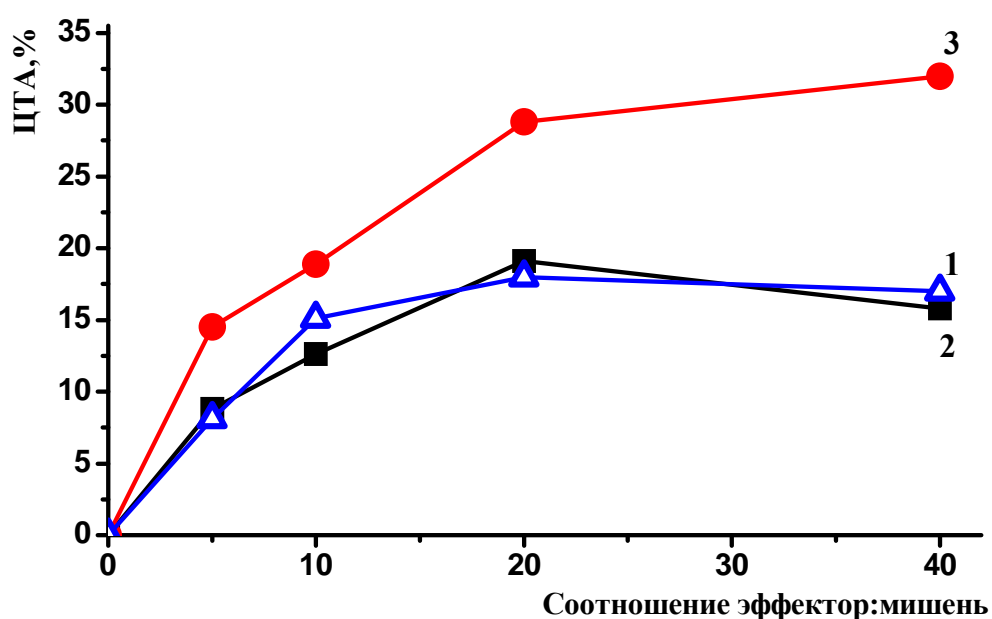


Рис.8. Антигенспецифическая ЦТА лимфоцитов, индуцированных контрольными зрДК (1) или зрДК, нагруженными пептидом MelanA/Mart (2), или комплексом пептида MelanA/Mart с rhHsp70 (3), в отношении клеток T2, рассчитанная по разности ЦТА в отношении контрольных клеток линии T2 и специфических для данного пептида клеток-мишеней T2, полученных при инкубации клеток T2 с этим пептидом.

Инкубация лимфоцитов со зрДК, обработанными комплексом rhHsp70-пептид (Рис.8, кривая 3), позволяет получить более высокий уровень специфической ЦТА по сравнению с теми случаями, когда лимфоциты инкубировали с контрольными ДК (Рис.8, кривая 1) или ДК, обработанными свободным пептидом (Рис.8, кривая 2). В последних двух вариантах уровень ЦТА был практически одинаков. Таким образом, введение пептида в зрДК в виде комплекса с rhHsp70 позволяет уже после двух стимуляций лимфоцитов такими ДК индуцировать специфический цитотоксический ответ, чего не происходит при введении в ДК свободного пептида.

9. Влияние обработки ДК комплексом rhHsp70 с ОСА лизата опухолевых клеток на антигенспецифическую ЦТА индуцированных лимфоцитов. Результаты, полученные при индукции ЦТЛ нЗДК, нагруженными комплексами rhHsp70 с лизатами опухолевых клеток, представлены на Рис.9. Сравнивая ЦТА лимфоцитов, индуцированных нЗДК, которые были нагружены лизатом (кривая 2) или комплексом пептидов лизата с

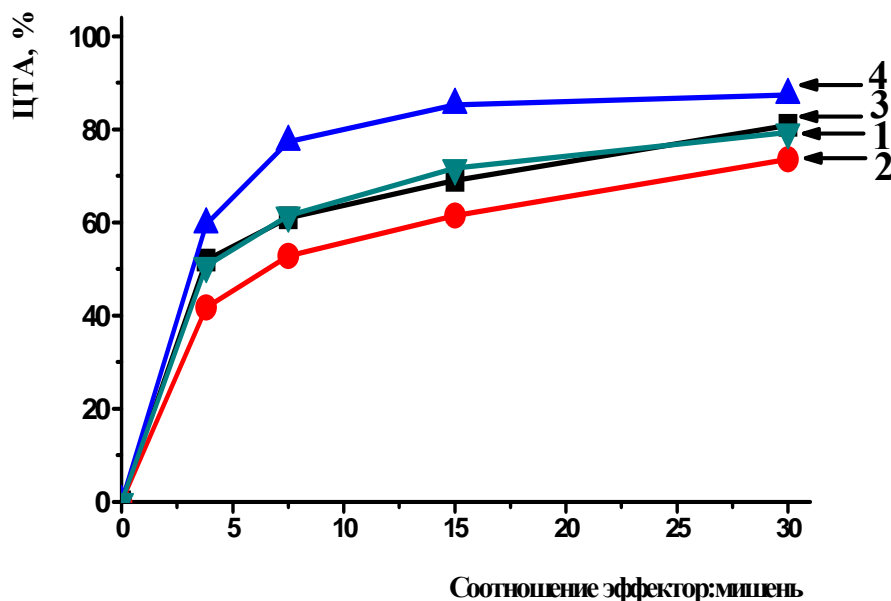


Рис.9. Антигенспецифическая ЦТА лимфоцитов, индуцированных контрольными нЗДК (1) или нЗДК, нагруженными лизатом опухолевых клеток (2), или нЗДК, обработанными rhHsp70 (3) или комплексом пептидов лизата с rhHsp70 (4). Представлены данные одного из трех типичных экспериментов.

rhHsp70 (кривая 4), с контрольными нЗДК (кривая 1) и с нЗДК, обработанными только rhHsp70 (кривая 3), следует отметить следующее. При взаимодействии нЗДК, нагруженных только лизатом опухолевых клеток, при двух циклах стимуляции лимфоцитов не удалось получить ЦТЛ с ЦТА более высокой, чем при использовании контрольных ДК, более того, в этих условиях отмечено снижение ЦТА лимфоцитов. При стимуляции лимфоцитов нЗДК, обработанными только rhHsp70, их ЦТА не отличалась от контроля. И только при индукции ЦТЛ нЗДК, нагруженными комплексами rhHsp70 с лизатами опухолевых клеток (кривая 4), ЦТА лимфоцитов была более высокой, чем при остальных рассмотренных условиях. Полученные результаты свидетельствуют о том, что использование комплексов rhHsp70 с пептидами лизатов опухолевых

клеток, даже в случае использования нЗДК, позволяет индуцировать более активные ЦТЛ.

Результаты, полученные при индукции ЦТЛ зрДК, нагруженными комплексами rhHsp70 с пептидами лизатов опухолевых клеток, представлены на Рис.10.

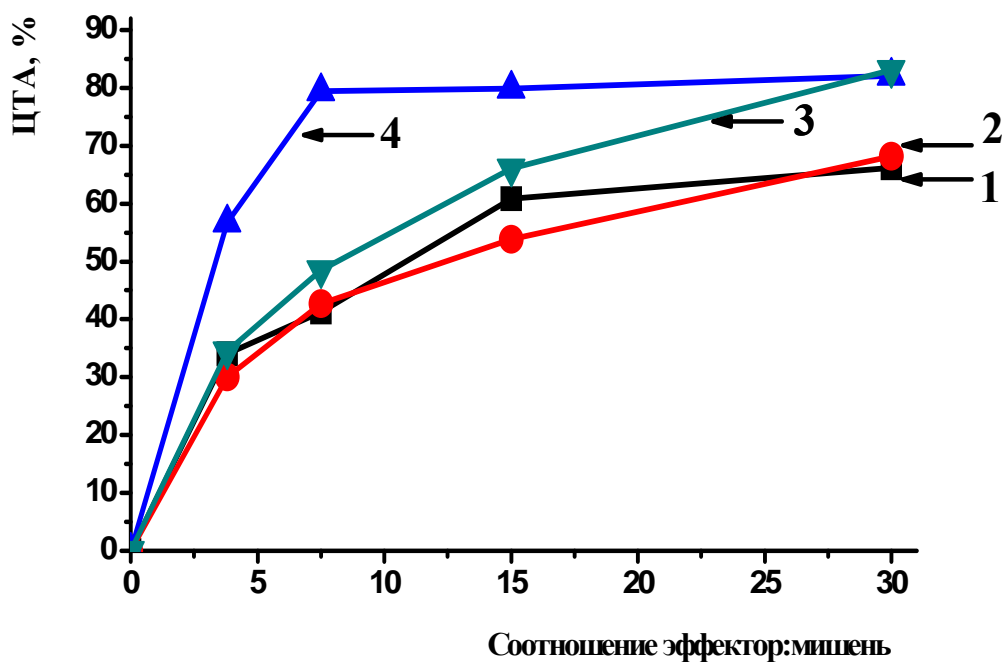


Рис.10. Антигенспецифическая ЦТА лимфоцитов в отношении клеток-мишеней линии LnCaP, индуцированная контрольными зрДК (1) или зрДК, нагруженными лизатом опухолевых клеток (2), или зрДК, обработанными белком rhHsp70 (3) или комплексом пептидов лизата с rhHsp70 (4).

Сравнивая ЦТА лимфоцитов, индуцированных зрДК, которые были нагружены лизатом или комплексом пептидов лизата с контрольными зрДК и со зрДК, обработанными только rhHsp70, следует отметить, прежде всего то, что при взаимодействии зрДК, нагруженных только лизатом опухолевых клеток при двух циклах стимуляции лимфоцитов, также не удавалось получить ЦТЛ с ЦТА, более высокой, чем при использовании контрольных ДК. Аналогичные значения ЦТА индуцированных лимфоцитов получены и при стимуляции лимфоцитов зрДК, обработанными только rhHsp70, хотя при высоком соотношении эффектор:мишень более заметно выявляется стимулирующее действие rhHsp70. И только при индукции ЦТЛ зрДК, нагруженными комплексами rhHsp70 с пептидами лизатов опухолевых клеток

(кривая 4), ЦТА лимфоцитов была существенно более высокой, причем ЦТА при низких соотношениях эффектор:мишень очень существенно превосходила уровень ЦТА, наблюдаемый при остальных рассмотренных условиях, превышая его на 20 – 40%.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что использование комплексов rhHsp70 с лизатами опухолевых клеток, в случае зрДК, позволяет индуцировать ЦТЛ с наиболее высокой ЦТА.

10. Содержание ИФγ и ФНОα в культуральной среде лимфоцитов через 24 часа после рестимуляции ДК. Результаты, полученные при исследовании влияния предварительной инкубации ДК с лизатом опухолевых клеток, белком rhHsp70 или комплексом rhHsp70 с антигенами из лизатов

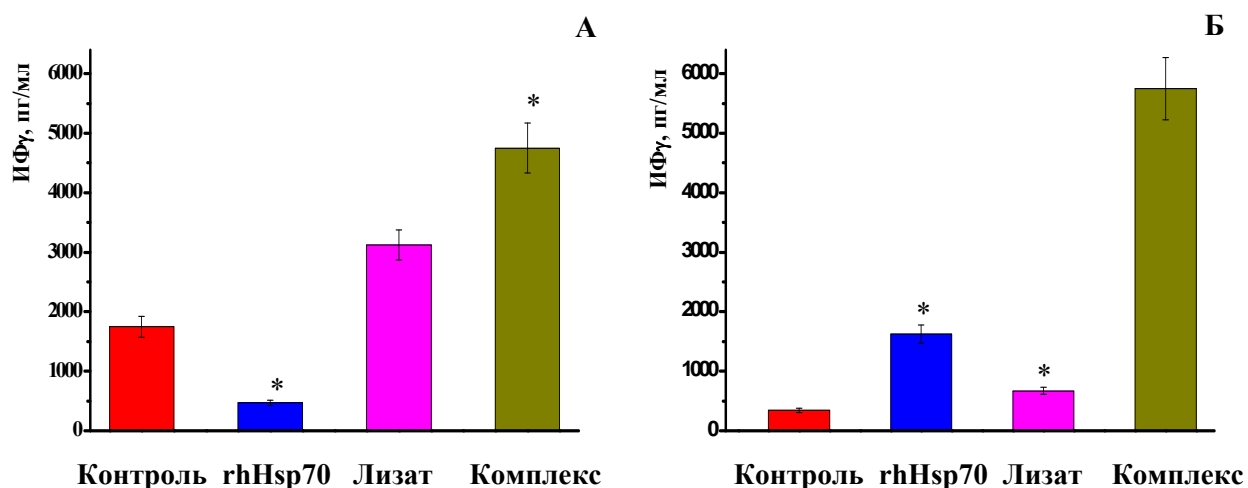


Рис.11. Содержание ИФγ в культуральной среде лимфоцитов через 24 часа после 2-й стимуляции изДК (А) или зрДК (Б) после предварительной инкубации ДК (18 часов) с препаратом rhHsp70 или комплексом rhHsp70 с антигенами из смеси лизатов опухолевых клеток.

опухолевых клеток на способность ДК стимулировать секрецию ИФγ и ФНОα лимфоцитами, представлены на Рис.11 и Рис. 12. Из этих результатов видно, что содержание ИФγ в культуральной среде лимфоцитов через 24 часа после рестимуляции лимфоцитов ДК было максимальным в том случае, если ДК предварительно подвергались обработке комплексом rhHsp70 с антигенами из лизатов опухолевых клеток. Такой эффект наблюдался как в случае обработки

комплексом зрДК, так и в случае обработки комплексом нзДК. Содержание ИФγ в культуральной среде лимфоцитов, инкубированных с такими ДК, было в несколько раз выше, чем содержание ИФγ в культуральной среде лимфоцитов, инкубированных с ДК, обработанными белком ghHsp70 или лизатом, или с контрольными ДК.

Обработка ДК белком ghHsp70 приводила к тому, что при последующей инкубации таких ДК с лимфоцитами, содержание ИФγ в культуральной среде снижалось по сравнению с контролем в случае обработки ghHsp70 нзДК и увеличивалось в случае такой обработки зрДК. Обработка нзДК лизатом опухолевых клеток приводила к двукратному повышению концентрации ИФγ в среде.

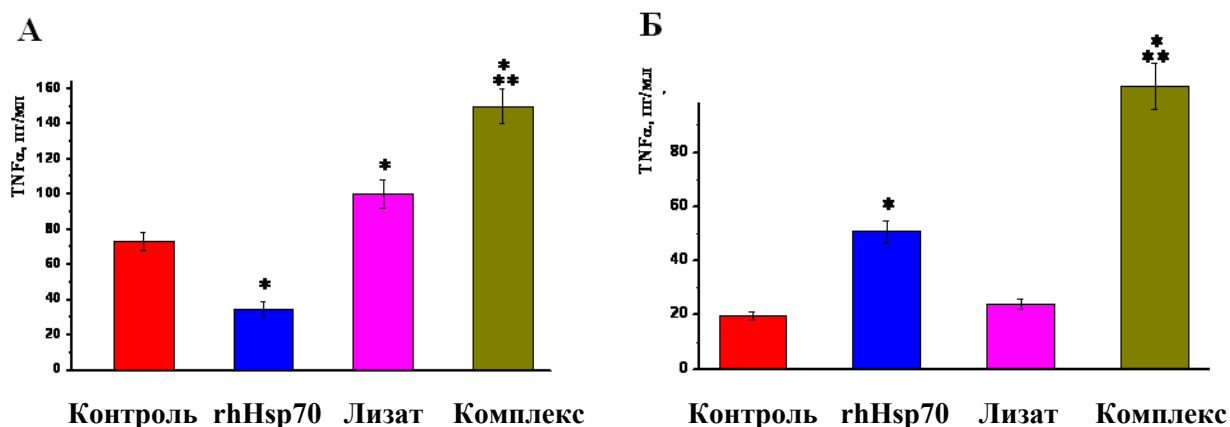


Рис.12. Содержание ФНОα в культуральной среде лимфоцитов, через 24 часа после 2-й стимуляции нзДК (А) или зрДК (Б) после предварительной инкубации ДК (18 часов) с препаратом ghHsp70 или комплексом ghHsp70 с антигенами из смеси лизатов опухолевых клеток.

Аналогичные результаты по влиянию комплекса ghHsp70 с антигенами из лизатов опухолевых клеток были получены в отношении ФНОα (Рис.12). Предварительная обработка ДК таким комплексом приводила к тому, что содержание ФНОα в культуральной среде лимфоцитов, индуцированных такими ДК, было более высоким, чем в других сериях. Таким образом, использование для стимуляции лимфоцитов ДК, обработанных комплексами ОСА с ghHsp70, приводит к повышению секреции лимфоцитами ИФγ и ФНОα.

Выводы.

1. Обнаружено, что выделенный и очищенный из штамма-продуцента *E.coli* рекомбинантный белок теплового шока человека rhHsp70A1B по иммунохимическим свойствам отличается от rhHsc70 и rHsp70 *M. tuberculosis*.
2. Показано, что rhHsp70A1B специфически связывается и эндоцитируется дендритными клетками человека.
3. Показано, что rhHsp70A1B ускоряет созревание незрелых дендритных клеток человека и повышает их антигенпредставляющую способность, а также индуцирует цитолитическую активность НК-клеток.
4. Обнаружено, что rhHsp70A1B стимулирует секрецию ФНО α и повышает способность дендритных клеток стимулировать неспецифическую ЦТА лимфоцитов при действии только на зрелые дендритные клетки.
5. Показано, что введение комплексов антигенов с Hsp70 в дендритные клетки можно проводить в присутствии АДФ и Mg²⁺, что обеспечивает стабильность этих комплексов.
6. Обнаружено, что использование различных опухолеспецифических антигенов при нагрузке зрелых дендритных клеток в форме комплексов с rhHsp70A1B позволяет индуцировать ЦТЛ с более высокой специфической цитотоксической активностью, чем при использовании свободных антигенов.
7. Показано, что стимуляция лимфоцитов дендритными клетками, в которые опухолеспецифические антигены вводили в виде комплексов с rhHsp70A1B, сопровождалась более высоким уровнем секреции цитокинов ФНО α и ИФ- γ .

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Савватеева Л.В., Гороховец Н.В., Черников В.А., Данилевский М.И., Северин С.Е. Получение рекомбинантного HSP70 человека. // Тезисы докладов Российского Медицинского Форума-2006 «Фундаментальная наука и практика». – Москва, 2006. – С.119.
2. Савватеева Л.В., Гороховец Н.В., Черников В.А., Данилевский М.И., Северин С.Е. Получение рекомбинантного HSP70A1B человека. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2007. - №3. – С.38-42.
3. Savvateeva LV, Gorokhovets NV, Chernikov VA, Danilevskiy MI, Severin SE. Recombinant human HSP70 and its potential application in cancer immunotherapy. // Abstracts of the International Scientific-Practical Interdisciplinary Workshop “New Technologies in Medicine and Experimental Biology”. – Bangkok-Pattaya, 2007. – P.62.
4. Данилевский М.И., Москалева Е.Ю., Гороховец Н.В., Попова О.Н., Северин С.Е. Иммунорегулирующая активность рекомбинантного Hsp70_{A1B} человека. // Российский иммунологический журнал. – 2008. – т.2. – С.123.
5. Москалева Е.Ю., Данилевский М.И., Гукасова Н.В., Морозова Н.С., Гороховец Н.В., Попова О.Н., Северин С.Е. Влияние препаратов человеческого и туберкулезного рекомбинантных белков теплового шока HSP70 на активность дендритных клеток и естественных киллеров. // Аллергология и иммунология. – 2008. – т.9(3) – С.257.
6. Гороховец Н.В., Данилевский М.И., Москалева Е.Ю., Северин С.Е. Характеристика рекомбинантного белка теплового шока Hsp70A1B человека как основы для создания противоопухолевых вакцин. // Материалы XII Онкологического конгресса. – Москва, 2008. – С. 212.
7. М. И. Данилевский, Е.Ю. Москалева, Н. В. Гороховец, О.Н. Попова, Д.Л. Беляев, С.Е. Северин. Влияние рекомбинантного белка теплового шока

Hsp70 человека на активность дендритных клеток разной стадии созревания. // Молекулярная Медицина. – 2009. – №3. – С.45–51.

8. Данилевский М.И., Москалева Е.Ю., Попова О.Н., Макаров В.А., Сахибов Я.Д., Сагдиева Н.Ш., Позднякова Л.П., Свешников П.Г., Северин С.Е. Влияние АДФ на способность дендритных клеток человека индуцировать антигенспецифические ЦТЛ *in vitro*. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2009. - №4. – С.28-33.