

*на правах рукописи*

**ШАПОВАЛ**  
**Андрей Иванович**

**НОВЫЕ КОСТИМУЛЯТОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ СЕМЕЙСТВА В7  
И РОЛЬ КОСТИМУЛЯЦИИ В АКТИВАЦИИ НК-КЛЕТОК**

**03.01.03 – молекулярная биология**  
**14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание учёной степени**  
**доктора биологических наук**

**Новосибирск – 2019**

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования "Алтайский государственный университет"

Научный консультант:

**Ильичев Александр Алексеевич**, д.б.н., профессор,  
Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора

Официальные оппоненты:

**Писарев Владимир Митрофанович**, д.м.н., профессор,  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии»

**Таранин Александр Владимирович**, д.б.н.  
Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения  
Российской академии наук

**Авдолян Ашот Меружанович**, д.м.н.  
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Алтайский филиал.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Защита состоится «21» июня 2019 г. в 12-00 на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Автореферат разослан «   » \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
к.х.н., доцент

В.В. Коваль

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Изучение роли костимуляторных молекул в иммунном ответе представляет собой важное направление современной иммунологии. Молекулярные взаимодействия между различными типами клеток обеспечивают развитие, поддержание и завершение иммунного ответа в норме, а также определяют исход патологических процессов. Важную роль в регуляции иммунного ответа и воспалительных процессов играют костимуляторные молекулы, которые также называют иммунологическими точками контроля (ИКТ).

В соответствии с современными представлениями, оптимальная активация Т-лимфоцитов требует двух сигналов: первый сигнал обеспечивается взаимодействием TCR (T cell receptor) с антигенным пептидом в контексте МНС (Major Histocompatibility Complex), второй сигнал обеспечивают костимуляторные молекулы. основополагающие работы дают основания утверждать, что сигнал только через TCR в отсутствие костимуляции приводит к развитию Т-клеточной анергии, или неспособности Т-лимфоцитов отвечать на последующее взаимодействие с антигеном (Schwartz *et al.*, 1989; Jenkins *et al.*, 1990). Таким образом, было постулировано, что костимуляция играет ключевую роль в определении исхода взаимодействия Т-лимфоцитов хелперов (CD4+ helper T cells) с антигеном, представленным в контексте МНС класса II антигенпрезентирующими клетками (АПК). Критическая роль костимуляции в регуляции иммунного ответа мотивировала усиление интереса к ее изучению, что привело к значительному росту исследований в этой области.

Данные о первых костимуляторных молекулах были опубликованы в конце 1980-х годов (June *et al.*, 1987). Было показано, что молекулы, принадлежащие к суперсемейству иммуноглобулинов, способны стимулировать или ингибировать иммунный ответ на антиген. Важно отметить, что к суперсемейству иммуноглобулинов также принадлежат сами иммуноглобулины, молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС, major histocompatibility complex)

и Т-клеточные рецепторы, т.е. все основные молекулы, участвующие в иммунном ответе. Все белки суперсемейства иммуноглобулинов имеют сходную структуру: они состоят из одного или нескольких переменных (variable (V)) и/или константных (constant (C)) доменов (Bajorath, Peach and Linsley, 1994). Первый костимуляторный лиганд был назван В7 (от **В** cell-restricted activation Ag **7**) (Freeman *et al.*, 1989). Позднее был обнаружен еще один лиганд, который был назван В7-2 (Freeman *et al.*, 1993). На основе В7-1 и В7-2 (CD80 и CD86 соответственно) из суперсемейства иммуноглобулинов было выделено В7 семейство костимуляторных молекул. Позднее В7 семейство молекул пополнилось новыми членами, о которых пойдет речь дальше.

Первые работы по изучению роли новых членов суперсемейства иммуноглобулинов в регуляции иммунного ответа определили функцию CD28 молекулы как рецептора, стимулирующего активацию наивных Т-лимфоцитов (June *et al.*, 1990), и показали, что члены семейства В7 молекул, В7-1 (CD80) и В7-2 (CD86) являются лигандами этого рецептора (Azuma *et al.*, 1993; Freeman *et al.*, 1989; Freeman *et al.*, 1993). Позднее было обнаружено, что молекула, гомологичная CD28, и названная CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4), также взаимодействует с В7-1 и В7-2 (Brunet *et al.*, 1987; Linsley *et al.*, 1991). Дальнейшие эксперименты с использованием нокаутных мышей показали, что CTLA-4 доставляет сигнал в Т-клетки, который снижает их активацию (Waterhouse *et al.*, 1995; Tivol *et al.*, 1995). Это дало основание заключить, что костимуляторные лиганды могут вызвать как активацию, так и ингибирование иммунного ответа, в зависимости от того, с каким рецептором они взаимодействуют. Дифференциальная экспрессия лигандов и рецепторов, индуцирующих активирующие и ингибирующие сигналы, обеспечивает регуляцию иммунного ответа.

Взаимодействие между В7-1/В7-2:CD28/CTLA-4 является одним из наиболее хорошо изученных молекулярных путей костимуляции. Сегодня обнаружены новые костимуляторные молекулы, которые относятся к суперсемействам иммуноглобулинов и фактора некроза опухоли (TNF – tumor

necrosis factor). Благодаря полученным знаниям о костимуляторных молекулах были разработаны терапевтические средства для лечения инфекционных онкологических и аутоиммунных заболеваний, отторжения органов при трансплантации.

Обнаружение новых костимуляторных молекул и изучение их функций несомненно позволит не только более полно понять тонкие механизмы активации и регуляции Т-лимфоцитов, но и разработать средства для манипуляции иммунным ответом в норме и патологии.

### Цели работы

Целью данной работы было исследование роли новых костимуляторных молекул в регуляции адаптивного и врожденного иммунного ответа.

В ходе работы было необходимо решить следующие основные задачи:

1. С помощью методов биоинформатики найти новые молекулы, гомологичные известным членам семейства B7 костимуляторных молекул.
2. Провести клонирование генов, кодирующих новые костимуляторные молекулы в клетках эукариот.
3. Разработать молекулярные инструменты для изучения функциональной активности новых костимуляторных лигандов.
4. Изучить экспрессию новых костимуляторных молекул в различных тканях и клетках человека.
5. Исследовать влияние рекомбинантных форм костимуляторных молекул на пролиферацию, продукцию цитокинов и цитотоксическую активность Т-лимфоцитов *in vitro*.
6. Оценить влияние новых костимуляторных молекул на регуляцию антиген-специфического иммунного ответа *in vivo*.
7. Исследовать роль костимуляторных молекул в активации NK-клеток.

## Научная новизна работы

Обнаружена новая костимуляторная молекула В7-Н3 (В7 Homolog 3), которая принадлежит к семейству В7, выяснена ее функциональная активность. В ходе выполнения работы созданы рекомбинантные химерные белки и клеточные линии, которые были использованы для изучения функциональной активности В7-Н3. Впервые показано, что В7-Н3 взаимодействует с Т-лимфоцитами, вызывает усиленную продукцию IFN- $\gamma$ , и как следствие этого, активирует цитотоксические CD8 Т-лимфоциты. В7-Н3 активирует противоопухолевый иммунитет и вызывает генерацию иммунологической памяти против опухоли.

Впервые продемонстрирована роль молекулы BTNЛ8 (Butyrophilin-like 8), принадлежащей к семейству бутирофилинов, в регуляции иммунного ответа. Выявлено взаимодействие внеклеточной части молекулы BTNЛ8 с Т-лимфоцитами. В экспериментах *in vivo* показано, что BTNЛ8 может стимулировать первичный иммунный ответ.

Впервые показано, что для оптимальной активации НК-клеток необходимы два сигнала. Первым сигналом является взаимодействие иммуноглобулинов с Fc-рецептором, второй сигнал доставляется внутрь клетки через костимуляторные молекулы.  $\gamma\delta$  Т-лимфоциты экспрессируют CD137L (4-1BBL) молекулу (из семейства TNF), которая играет важную роль в костимуляции НК-клеток. CD137L усиливает экспрессию NKG2D рецептора, который опосредует цитотоксическую активность НК-клеток. Бисфосфонаты, которые применяются для терапии онкологических заболеваний (Золедронат, или Зомета), индуцируют активацию  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов, увеличивают экспрессию CD137L, что приводит к усилению прямой и антителозависимой цитотоксичности НК-клеток против опухолей.

## Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы обусловлена тем, что в ней описаны две новые костимуляторные молекулы В7-Н3 и ВТNL8 с уникальными свойствами, расширяющими наши представления об участии костимуляторных молекул в регуляции иммунного ответа. Так, описаны особенности экспрессии новых костимуляторных молекул в различных органах и тканях человека. Определена экспрессия предполагаемых рецепторов на Т-лимфоцитах, взаимодействующих с новыми костимуляторными лигандами, представленными на АПК. Предложено использовать рекомбинантные химерные белки, содержащие внеклеточную часть костимуляторных молекул, для регуляции иммунного ответа. Выявлено, что В7-Н3 и ВТNL8 играют ключевую роль в активации противоопухолевого антиген-специфического ответа.

Полученные результаты о функциональной активности и экспрессии В7-Н3 позволили приступить к клиническим испытаниям моноклональных антител против В7-Н3 для терапии онкологических заболеваний. В настоящее время проводится 11 клинических испытаний, где изучается безопасность и терапевтические эффекты МАТ против В7-Н3 на пациентах с различными онкологическими заболеваниями, которые не чувствительны к другим видам терапии (Flem-Karlsen *et al.*, 2018).

На основании полученных результатов было предположено, что для активации клеток естественного иммунитета, таких как НК-клетки, требуются два сигнала. Первый сигнал передается через Fc-рецептор иммуноглобулинов, а второй костимуляторными молекулами. В частности, CD137L, который экспрессируется на активированных  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитах и таким образом обеспечивает костимуляцию НК-клеток после контакта с иммобилизованными иммуноглобулинами.

Результаты работы позволили предложить модель для улучшения существующих методов иммунотерапии онкологических заболеваний. Комбинирование опухолеспецифических МАТ, которые взаимодействуют с Fc-рецептором на НК-клетках (Цетуксимаб и Ритуксимаб), и агентов, активирующих  $\gamma\delta$  Т-лимфоциты, применяемых в клиниках, такие как, Зомета (Zometa), может

улучшить иммунотерапию рака через активацию адаптивного и естественного иммунитета.

### **Внедрение результатов работы в практику**

В настоящее время проводятся 11 клинических испытаний, спонсированных компанией MacroGenics (США), где МАТ против В7-Н3 используются в качестве монотерапии или в комбинации с другими МАТ (Ипилиумаб/анти-СТЛА-4 и Пембролизумаб/анти-PD-1) для терапии рака простаты, поджелудочной железы, яичника, желудка, рака легкого и др.

Результаты диссертационной работы могут быть использованы для разработки клинического протокола по применению комбинации Зометы и МАТ (Цетуксимаб и Ритуксимаб) для терапии лимфомы и плоскоклеточной карциномы головы и шеи. Кроме того, возможно использование рекомбинантных химерных белков костимуляторных молекул для повышения эффективности существующих вакцин против инфекций и онкологических заболеваний.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. В7-Н3 молекула является новым представителем семейства костимуляторных молекул В7. В присутствии антигенного сигнала В7-Н3 вызывает усиление активации Т-лимфоцитов и активирует противоопухолевый иммунный ответ.
2. BTNL8 принадлежит к семейству бутирофилинов и обладает костимуляторными свойствами. BTNL8 взаимодействует с неизвестным рецептором на поверхности покоящихся Т-клеток и способен костимулировать пролиферацию и продукцию цитокинов Т-лимфоцитами. Инъекция BTNL8Ig химерного рекомбинантного белка во время иммунизации приводит к усилению первичного иммунного ответа.
3. Для оптимальной активации NK-клеток требуется два сигнала. Первый доставляется через взаимодействие иммуноглобулинов с Fc-рецептором,



второй обуславливается CD137 костимуляторной молекулой. Бисфосфанаты вызывают экспрессию CD137, костимуляторной молекулы, на поверхности  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов, которая обеспечивает активацию НК-клеток, примированных с иммобилизованными иммуноглобулинами. Через увеличение экспрессии CD137 бисфосфанаты усиливают прямую и антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) НК-клеток.

### **Апробация работы и публикации**

Основные результаты работы опубликованы в 21 статье в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, включая Nature Medicine, Nature Immunology, Immunity, Blood, Journal of Immunology, Clinical Cancer Research, Molecular Biotechnology, Cancer Research, Molecular Immunology, Cancer Immunology and Immunotherapy. Результаты диссертационной работы доложены на международных конференциях, включая Annual meetings of the American Association of Immunologists, Experimental Biology, FASEB, American Association of Cancer Research и др. Также результаты и методы, используемые в работе, опубликованы в двух главах книг. Часть первичных данных для диссертации получены в Клинике Мэйо (Mayo Clinic), г. Рочестер, Миннесота, США (1998-2002); компании CuroGen, г. Брэнфорд, Коннектикут, США (2005-2008); университете Мэриленда, г. Балтимор, Мэриленд, США (2008-2012); университете штата Аризона, г. Темпи, Аризона, США (2013-2018).

### **Личный вклад автора**

Представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором либо при его непосредственном участии на всех этапах исследования, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

## **Структура и объем диссертации**

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов исследований, обсуждения результатов и списка литературы, заключения. Диссертация изложена на 219 страницах, включает в себя 4 таблицы и 44 рисунка. Список цитируемой литературы состоит из 319 источников, из них 2 отечественные и 317 иностранные.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Для выполнения данной работы был применен широкий спектр методов биоинформатики, молекулярной биологии и иммунологии такие как: работа с клеточными линиями, клонирование ДНК, конструирование рекомбинантных плазмид, очистка рекомбинантных плазмид; экспрессия рекомбинантных генов *in vitro* с использованием эукариотических клеток; получение стабильных клонов опухолевых клеток, экспрессирующих рекомбинантные белки; очистка рекомбинантных белков; анализ РНК с помощью нозерн-блоттинга; полимеразная цепная реакция в реальном времени; анализ белков с помощью вестерн-блоттинга; работа с лабораторными животными; иммунизация лабораторных животных; выделение и очистка клеточных популяций с использованием магнитных частиц; проточная цитометрия; пролиферация и продукция цитокинов Т-лимфоцитами; иммуноферментный анализ; генерация цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ); оценка цитотоксичности; рост опухолей и пролиферация ЦТЛ *in vivo*.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### В7-Н3

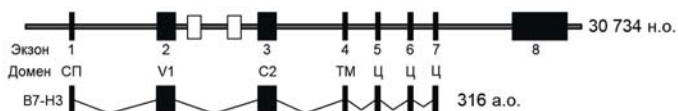
#### 1. Клонирование В7-Н3

Молекулы семейства В7 (В7-1, В7-2, В7-Н1 и В7-Н2) играют важную роль в регуляции иммунного ответа. Основываясь на этих наблюдениях, мы предположили, что в постгеномную эру среди новых обнаруженных генов могут существовать молекулы, имеющие гомологию с известными молекулами семейства В7, которые также вовлечены в регуляцию иммунного ответа. С использованием всех ранее опубликованных данных о последовательностях молекул семейства В7 был произведен поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей в открытой базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) и частной базе данных Human Genome Sciences Inc. (США). Среди нуклеотидных последовательностей, присутствующих в дендритных клетках человека, была выявлена молекула, которая имеет характеристики, сходные с молекулами семейства В7. Наличие нуклеотидной последовательности, кодирующей новую молекулу семейства В7, в антигенпрезентирующих клетках было подтверждено путем анализа мРНК, выделенных из ТНР-1 и дендритных клеток, с помощью ПЦР. Молекула была названа В7-Н3 (В7 Homolog 3). Найденная нуклеотидная последовательность кодирует две изоформы белка, 316 и 534 а.о. (рис. 1). Идентичность в предсказанной аминокислотной последовательности внеклеточного домена короткой изоформы новой молекулы с другими человеческими молекулами семейства В7 достигала: В7-Н2 – 32 %, В7-Н1 – 27 %, В7-1 – 23 %, В7-Н7 – 23 %, В7-2 – 21 %, В7-Н6 – 21 %, В7-Н4 – 17 %, В7-Н5 – 17 %.

## Homo Sapiens



## Mus musculus



**Рисунок 1.** Геномная организация локуса В7-Н3 человека и мыши. Последовательности взяты из базы данных NCBI. NC\_000015.10 – Homo sapiens и NC\_000075.6 – Mus musculus

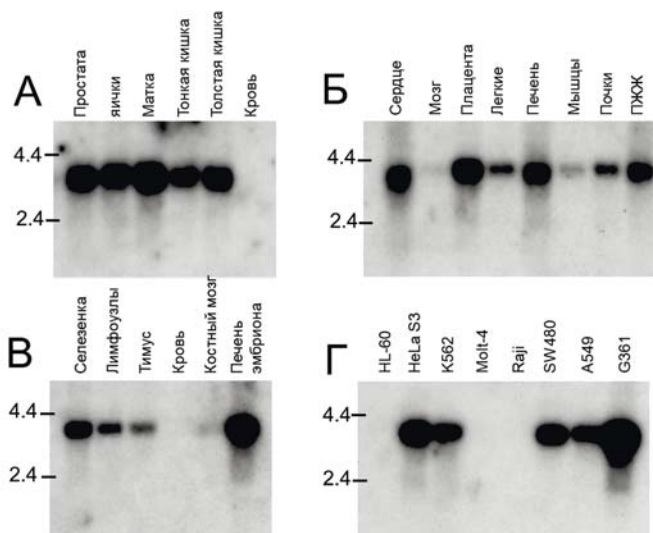
4Ig В7-Н3 состоит из 10 экзонов, кодирующих сигнальный пептид (СП), V1 домен, C1 домен, V2 домен, C2 домен, трансмембранный домен и три цитоплазматических домена. Короткая форма В7-Н3 образуется за счет альтернативного сплайсинга экзона 2 и экзона 5, что приводит к отсутствию C1 и V2 доменов (рис. 1). Предсказанный короткий В7-Н3 белок состоит из N-концевого сигнального пептида; внеклеточных V- и C- Ig доменов; трансмембранного домена и цитоплазматического хвоста в 45 а.о. Это означает, что В7-Н3 является трансмембранным белком I-го типа, принадлежащего к суперсемейству иммуноглобулинов. Как и другие члены В7 семейства, В7-Н3 имеет четыре консервативных цистеина, которые принимают участие в формировании V- и C- Ig доменов. Отсутствие гептад (heptad) а.о. последовательности (НРНСРС) и С-концевого В30.2 домена указывает на то, что В7-Н3 не принадлежит к гликопротеинам семейства бутирофилинов (butyrophilin) и миелин-олигодендроцитов (myelin oligodendrocyte) (Linsley et al., 1994; Henry et al., 1999). Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что В7-Н3 относится к семейству молекул В7.

Анализ мышинового генома показал, что мышинный В7-Н3 состоит из 8 экзонов. Мышиный ген содержит два псевдоэкзона (C1 и V2), в

последовательностях которых содержатся множественные стоп-кодоны; в результате у мыши обнаружена только одна, короткая изоформа В7-Н3 (рис. 1).

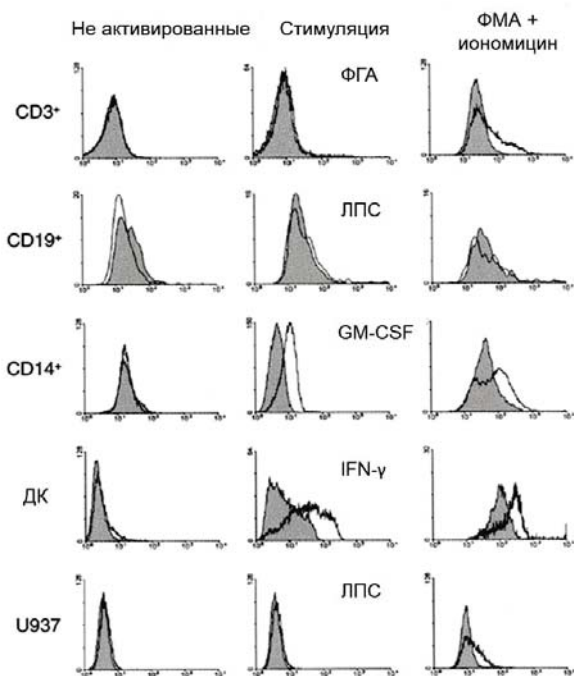
## 2. Экспрессия В7-Н3

Нозерн-блот с тканями человека показал, что В7-Н3 кодируется мРНК размером 4,1-кб и экспрессируется во многих тканях человека, включая сердце, печень, плаценту, простату, семенники, матку, поджелудочную железу, тонкий и толстый отделы кишечника. мРНК, кодирующая В7-Н3, также была найдена в головном мозге, скелетных мышцах, почках и легких (рис. 2А и 2Б). В7-Н3 мРНК также была обнаружена в нескольких лимфоидных органах, в том числе в селезенке, лимфатических узлах, костном мозге, эмбриональной печени и тимусе (рис. 2В). Однако В7-Н3 мРНК не была обнаружена в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) (рис. 2В). Несколько линий опухолевых клеток, в том числе клетки меланомы G361, аденокарциномы шейки матки HeLa S3, хронической миелоидной лейкемии K562, карциномы легких A546 и колоректальной аденокарциномы SW480, также экспрессируют В7-Н3 мРНК (рис. 2Г). Другие клеточные линии лимфоидного происхождения Molt-4 (лимфобластный лейкоз) и Раджи (лимфома Беркитта) не имеют В7-Н3 мРНК. Равные количества мРНК, кодирующей β-актин, были обнаружены во всех образцах клеток и тканей (данные не представлены). Наличие В7-Н3 мРНК было подтверждено с помощью ПЦР в K562, U937, ТНР-1 и дендритных клетках, но не в Raji, Jurkat или Molt-4 клетках (данные не представлены).



**Рисунок 2.** Нозерн-блот-анализ V7-N3 мРНК. Общая РНК была выделена из тканей человека (А, Б и В) и опухолевых клеток (Г). Каждая дорожка содержит 1 мкг мРНК. Молекулярные маркеры указаны в 1000 н.о. V7-N3 кДНК использовалась в качестве зонда

Используя сыворотки, полученные путем иммунизации мышей гидрофильным пептидом из внеклеточной части молекулы V7-N3, было определено, что V7-N3 белок экспрессируется на поверхности дендритных клеток, моноцитов и Т-лимфоцитов только после их активации (рис. 3).

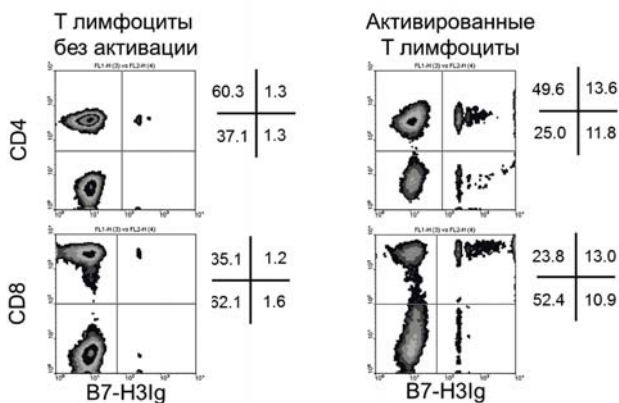


**Рисунок 3.** Анализ экспрессии В7-Н3 с помощью проточной цитометрии. Клетки инкубировали с иммунными сыворотками против В7-Н3 (незаполненная гистограмма) или контрольными сыворотками (серая гистограмма) плюс FITC-конъюгированные антитела против мышинного IgG. Уровень интенсивности флуоресценции для нестимулированных CD3+ Т-лимфоцитов; CD19+ В-клеток; CD14+ моноцитов, дендритных клеток и U937 клеток (левые гистограммы), те же клетки, инкубированные с указанными физиологическими стимуляторами (центральные гистограммы) или клетки, инкубированные с комбинацией ФГА и иономицин (правые гистограммы)

### 3. Предполагаемый В7-Н3 рецептор экспрессируется на активированных Т-лимфоцитах

Для того чтобы определить, на каких клетках экспрессируется предполагаемый рецептор, взаимодействующий с В7-Н3, был создан химерный рекомбинантный белок В7-Н3Ig, где внеклеточная часть молекулы В7-Н3 была соединена с Fc-фрагментом человеческого иммуноглобулина IgG1. Результаты проточной цитометрии показывают, что неактивированные CD4+ и CD8+ Т-

лимфоциты не экспрессируют рецептор, взаимодействующий с В7-Н3 (рис. 4). Однако стимуляция Т-лимфоцитов с фитогемагглютинин (ФГА) в течение 24 часов приводила к экспрессии В7-Н3 рецептора (рис. 4), которая исчезала к 48 часам после начала стимуляции. Таким образом, наши результаты говорят о временной экспрессии рецептора В7-Н3 на ранних сроках активации Т-лимфоцитов. В7-Н3Ig не взаимодействовал с другими клеточными популяциями, такими как NK-клетки, В-клетки и макрофаги.



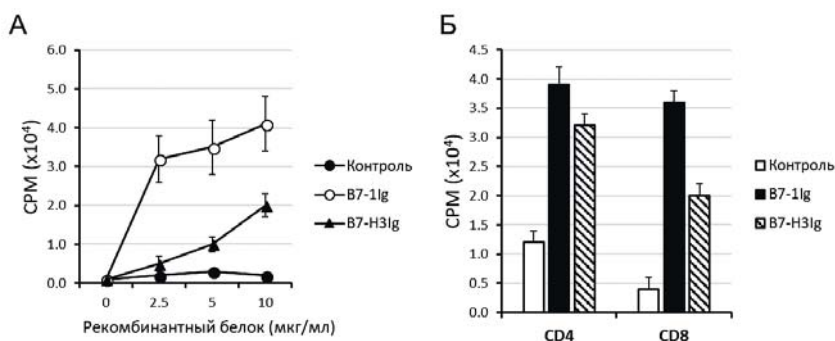
**Рисунок 4.** Взаимодействие В7-Н3Ig с CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами. Неактивированные (левые панели) или ФГА-активированные Т-лимфоциты (правые панели) красили с В7-Н3Ig и МАТ против CD3, CD4 и CD8 молекул. Клетки гейтировали по экспрессии CD3 в популяции лимфоцитов и определяли взаимодействие В7-Н3Ig с CD4<sup>+</sup> (верхние панели) или CD8<sup>+</sup> (нижние панели) Т-лимфоцитами

В ходе экспериментов было выяснено, что ни один из тестируемых рекомбинантных химерных белков рецепторов семейства В7 (CTLA-4Ig, ICOSIg и PD-1Ig) не взаимодействовал с В7-Н3 трансфицированными 293 клетками. Был сделан вывод, что потенциальный рецептор для В7-Н3 лиганда экспрессируется на активированных Т-лимфоцитах и отличается от CTLA-4, ICOS и PD-1.



#### 4. В7-Н3 молекула костимулирует Т-клеточный ответ

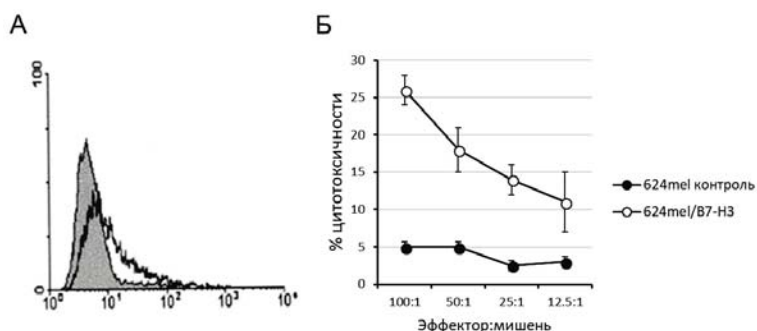
Так как было показано, что рецептор В7-Н3 экспрессируется на Т-лимфоцитах, в дальнейших экспериментах мы изучали влияние В7-Н3 на функцию Т-клеток. Для этого очищенные Т-лимфоциты инкубировали с МАТ против CD3 молекулы, иммобилизованными на поверхности 96-луночных планшетов в присутствии также иммобилизованного рекомбинантного белка В7-Н3Ig. В присутствии субоптимальной дозы анти-CD3 МАТ и В7-Н3Ig отмечалось усиление пролиферации Т-лимфоцитов (рис. 5А). Иммобилизованный В7-Н3Ig усиливал пролиферацию как CD4+, так и CD8+ Т-клеток (рис. 5Б).



**Рисунок 5.** В7-Н3 костимулирует TCR опосредованную пролиферацию Т-лимфоцитов. (А) Т-клетки культивировались в плоскостном 96-луночном планшете с иммобилизованными МАТ против CD3 (40 нг/мл) и указанными концентрациями В7-1Ig, В7-Н3Ig или контрольных Ig. (Б) CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты, очищенные с помощью магнитных частиц, инкубировались с иммобилизованными МАТ антителами против CD3 (40 нг/мл) + В7-1Ig, В7-Н3Ig или контрольными Ig (10 мкг/мл) в 96-луночных планшетах. После 48 часов инкубации в лунки добавляли <sup>3</sup>Н-тимидин (1 µCi/well) и культивировали еще 24 часа

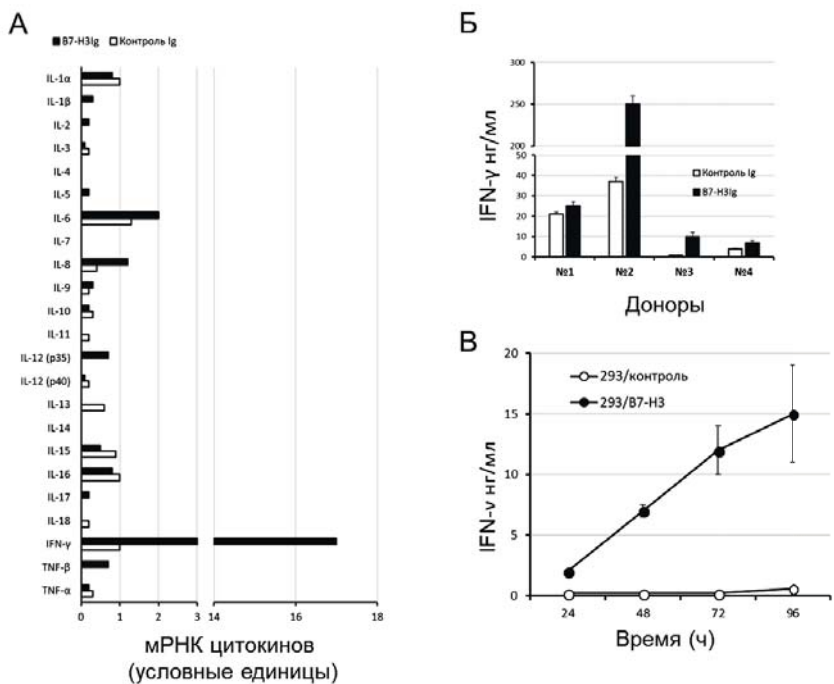
Было также показано, что 624mel клетки, экспрессирующие В7-Н3 на поверхности (рис. 6А), индуцируют цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) (рис. 6Б). Таким образом, наши результаты показывают, что В7-Н3 может

костимулировать пролиферацию CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов и генерацию ЦТЛ *in vitro*.



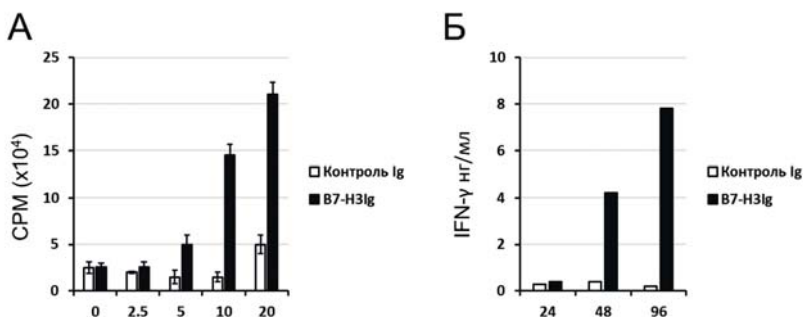
**Рисунок 6.** В7-Н3 усиливает генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов. (А) Клетки меланомы 624mel, трансфицированные рекомбинантной плазмидой, кодирующей В7-Н3 (серые гистограммы), или контрольной плазмидой, были окрашены с иммунными сыворотками против В7-Н3. (Б) Т-клетки инкубировали 96 часов с 624mel клетками, экспрессирующими В7-Н3, или контрольными клетками. Цитотоксическая активность тестировалась с помощью стандартного теста высвобождения  $^{51}\text{Cr}$

Из данных, представленных на рис. 7А, следует, что Т-клетки, инкубированные с субоптимальной дозой anti-CD3 МАТ и В7-Н3Ig, экспрессировали в 18 раз больше мРНК IFN- $\gamma$  в сравнении с контрольной группой. Небольшое, но, возможно, значительное увеличение экспрессии мРНК, кодирующей IL-8 и TNF- $\alpha$ , было также обнаружено в Т-лимфоцитах, инкубированных в присутствии анти-CD3 МАТ и В7-Н3Ig. Также с использованием иммуноферментного анализа (ИФА), было подтверждено, что Т-лимфоциты продуцируют увеличенное количество IFN- $\gamma$  при стимуляции их анти-CD3 + В7-Н3Ig (рис. 7Б и 7В). В дополнение Т-лимфоциты, инкубированные с 293 клетками, экспрессирующими на поверхности В7-Н3, секретировали значительно больше IFN- $\gamma$  в сравнении с контролем. Таким образом, полученные результаты говорят о том, что костимуляция через В7-Н3 молекулу селективно повышает продукцию IFN- $\gamma$ .



**Рисунок 7.** В7-Н3 усиливает продукцию IFN- $\gamma$ . (А) Т-лимфоциты периферической крови, очищенные с помощью магнитных частиц, инкубировали ( $5 \times 10^6$  клеток/лунку) в 24-луночных планшетах с иммобилизованными анти-CD3 МАТ (40 нг/мл) с В7-Н3Ig или контрольными Ig (10 мкг/мл). После 24 часов инкубации из клеток выделяли РНК, которую переводили в кДНК с использованием реверс-транскриптазы в присутствии  $\alpha$ - $^{32}$ P-dCTP. Меченые кДНК гибридизировали на GEArray мембранах. Уровни мРНК, кодирующие цитокины, выражались в условных единицах пропорционально мРНК, кодирующей  $\beta$ -актин. Результаты одного из двух независимых экспериментов показаны. (Б) Т-клетки ( $5 \times 10^6$  клеток/лунку), обогащенные с использованием волокон нейлона, культивировались в 24-луночных планшетах с иммобилизованными анти-CD3 МАТ (40 нг/мл) с В7-Н3Ig или контрольными Ig (10 мкг/мл). Супернатанты собирали после 24 часов инкубации и концентрацию IFN- $\gamma$  измеряли с помощью ИФА. (В) Мононуклеарные клетки периферической крови ( $5 \times 10^6$  клеток/лунку) инкубировались с облученными НЕК293Т клетками, трансфицированными родительской рсDNA3.1 (–) плазмидой (293/контроль) или В7-Н3 рсDNA вектором (293/В7-Н3). Супернатанты собирались в указанные точки времени, и концентрацию IFN- $\gamma$  измеряли с помощью ИФА

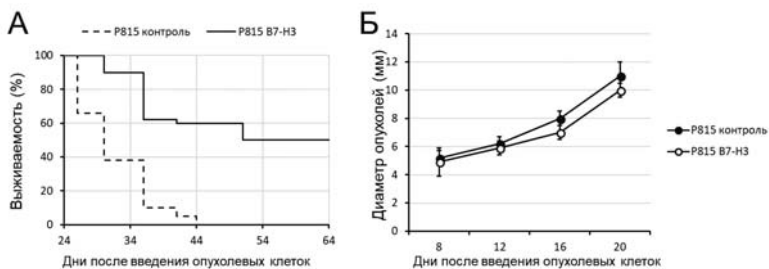
Из результатов, представленных на рис. 8, видно, что рекомбинантный белок В7-Н3Ig, сконструированный из внеклеточной части мышиной В7-Н3 и Fc-фрагмента мышинового IgG2a, усиливает пролиферацию мышинных Т-лимфоцитов (рис. 8А) и продукцию IFN- $\gamma$  (рис. 8Б) в ответ на субоптимальную стимуляцию с анти-CD3 МАТ. При этом костимуляторный эффект был дозозависимым. Контрольный Fc-фрагмент мышинового IgG2a (Ig) не влиял на пролиферацию и продукцию IFN- $\gamma$  Т-клетками. Таким образом, мышинный гомолог В7-Н3 имеет сходную костимуляторную функцию с человеческой молекулой.



**Рисунок 8.** В7-Н3 костимулирует Т-клеточный ответ у мышей. Анти-CD3 МАТ индуцированная пролиферация (А) и продукция IFN- $\gamma$  (Б) мышинными Т-лимфоцитами, инкубированными в присутствии В7-Н3Ig (черные столбики) или контрольного Ig (белые столбики)

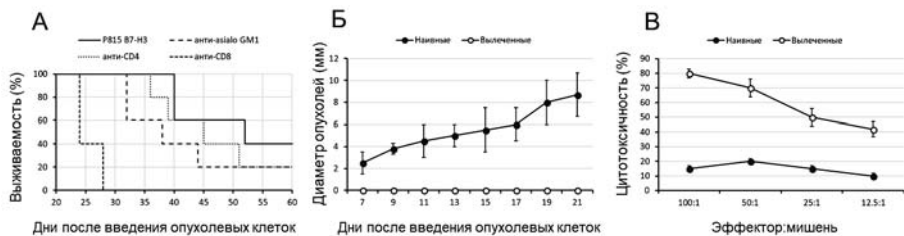
## 6. Эффект В7-Н3 экспрессии на противоопухолевый иммунный ответ

Нами было обнаружено, что 44 % экспериментальных животных отторгают Р815 опухоли, которые экспрессируют В7-Н3 на своей поверхности (рис. 9А). Однако, когда Р815 В7-Н3 инокулировали в иммунодефицитных мышей BALB/c nu/nu, контрольные опухоли и опухоли, экспрессирующие В7-Н3, росли с одинаковой скоростью (рис. 9Б). Эти результаты свидетельствуют о том, что экспрессия В7-Н3 усиливает иммуногенность мастоцитомы Р815.



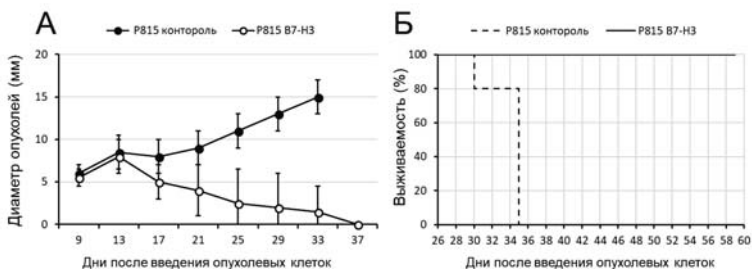
**Рисунок 9.** Трансфекция В7-Н3 снижает скорость роста сингенных опухолей у иммунокомпетентных мышей. DBA/2 (А) или BALB/c nu/nu (Б) мыши получали инъекцию контрольных Р815 опухолевых клеток или В7-Н3, экспрессирующих Р815. Выживаемость мышей (А) наблюдали ежедневно, диаметр опухолей (Б) измеряли раз в 4 дня

Для того чтобы определить клеточные механизмы отторжения опухолей, экспрессирующих В7-Н3, мышам DBA/2 вводили Р815 В7-Н3 клетки и антитела против CD4, CD8 или NK-клеток. Инъекция антител против CD4 или NK-клеток не имела значимого эффекта на рост Р815 В7-Н3 клеток. Однако МАТ против CD8 полностью снимали резистентность мышей к росту опухоли, экспрессирующей В7-Н3. Все мыши погибли в течение 30 дней (рис. 10А). Таким образом, наши результаты свидетельствуют, что CD8 клетки играют ключевую роль в противоопухолевом иммунном ответе, регулируемом В7-Н3 молекулой. Более того, мыши, которые отторгли Р815 опухоли, экспрессирующие В7-Н3, были резистентны к повторной инокуляции клеток дикого типа линии Р815 (рис. 10Б) и показали повышенный уровень активности ЦТЛ, способных лизировать клетки Р815 (рис. 10В), что говорит о развитии специфической иммунологической памяти против опухоли Р815. У мышей, не получавших инъекцию Р815 клеток, экспрессирующих В7-Н3, инокуляция родительских Р815 клеток приводила к росту опухолей без генерации опухолеспецифических ЦТЛ (рис. 10Б и 10В).



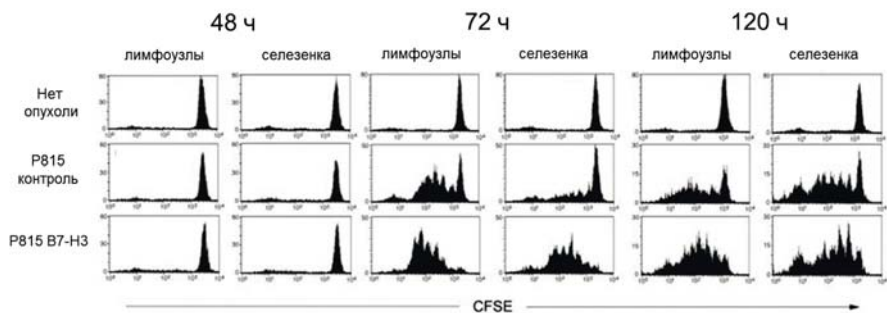
**Рисунок 10.** Экспрессия В7-Н3 на Р815 клетках усиливает опухолеспецифический ЦТЛ ответ. (А) DBA/2 мышам вводили Р815 В7-Н3 клеток, мыши также получали инъекцию МАТ против CD4, CD8 или asialo GM1 на 1, 7 и 14 день. Выживаемость мышей контролировали каждый день. (Б) Мышам, которые отторгли Р815 В7-Н3 опухоли (○) повторно, вводили Р815 клетки через 60 дней после первичной инъекции опухолевых клеток. DBA/2 мыши без предварительных инъекций (●) служили в качестве контроля. (В) Цитотоксическая активность спленоцитов, полученных от мышей, которые отторгли вторичные инъекции Р815, измерялась с использованием стандартного теста высвобождения радиоактивного  $^{51}\text{Cr}$

Роль опухолеспецифических CD8<sup>+</sup> ЦТЛ также была подтверждена с использованием P1 TCR трансгенных мышей. CD8 клетки этих мышей экспрессируют TCR специфический для P1A антиген, который присутствует в Р815 опухолях и представлен в контексте H-2L<sup>d</sup> МНС. Нами был проведен адаптивный перенос спленоцитов (10<sup>6</sup> клеток) от мышей P1A в мышей F1 (DBA/2 x BALB/c), которые также получили инокуляцию клеток Р815 или Р815 В7-Н3. У мышей, получивших инъекцию P1A спленоцитов и Р815 клеток дикого типа, наблюдалось развитие летальных опухолей, в то время как Р815 В7-Н3 клетки отторгались и мыши жили более 40 дней после инокуляции опухолевых клеток (рис. 11А и 11Б), однако наблюдался временный рост опухолей в первые дни после инокуляции. Использование адаптивного переноса P1A лимфоцитов позволило нам разработать модель для детального исследования роли В7-Н3 опосредованной костимуляции *in vivo*.



**Рисунок 11.** Экспрессия В7-Н3 усиливает активность опухолеспецифических CD8 Т-лимфоцитов. В6хD2F1 мышам вводили i.v.  $1 \times 10^6$  спленоцитов от P1 TCR трансгенных мышей. Эти мыши в тот же день получали s.c. инъекцию  $1 \times 10^6$  Р815 контроль (●) или Р815 В7-Н3 клеток (○). Размер опухолей (А) и выживаемость мышей (Б) фиксировали 2–3 раза в неделю в течение эксперимента

С использованием адаптивного переноса Р1А-ЦТЛ была исследована роль В7-Н3 в пролиферации опухолеспецифических лимфоцитов. F1 мышам, получавшим инъекцию Р815 В7-Н3 клеток, вводили Р1А-ЦТЛ, обработанных CFCE. На 2, 3 и 5 день после введения Р1А-ЦТЛ клетки селезенки и лимфоузлов, дренирующих опухоли, исследовались на уровень интенсивности CFCE флуоресценции (индикатор количества циклов пролиферации). На 3 день регистрировалась значительная пролиферация Р1А-специфических ЦТЛ в селезенке и лимфоузлах мышей с Р815 В7-Н3 опухолями (рис. 12). Таким образом, полученные результаты говорят о том, что В7-Н3 стимулирует деление опухолеспецифических ЦТЛ в лимфоидных органах, что объясняет усиление противоопухолевого иммунного ответа.



**Рисунок 12.** P815 клетки, экспрессирующие B7-H3, индуцируют пролиферацию опухолеспецифических ЦТЛ *in vivo*. C57xD2F1 мышам вводили s.c.  $1 \times 10^6$  P815 или P815 B7-H3 клеток. На 6 день мыши получали i.v. инъекцию очищенных CD8+ P1A-ЦТЛ, меченных с CFSE. Лимфоузлы, дренирующие опухоли и селезенки, собирали на 2, 3 и 5 день после введения ЦТЛ. Клетки красили с P1A/H-2d димером и CD8 MAT конъюгированных с CyChrome для гейтирования, деление клеток определяли с помощью проточной цитометрии

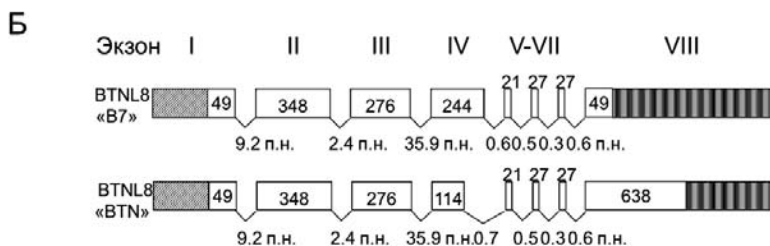
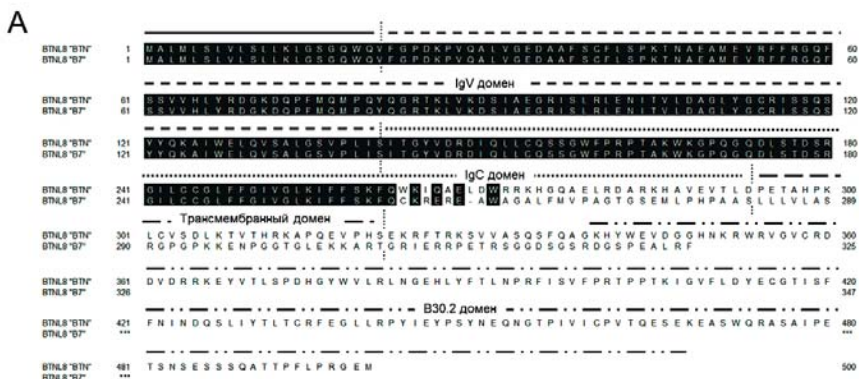
## BTNL8

### 1. Клонирование BTNL8

С использованием последовательностей внеклеточной части описанных молекул семейства B7 был произведен поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей в открытых и частных базах данных. Было найдено множество мРНК и EST, кодирующих предполагаемый белок, сходный с молекулами семейства B7. Дальнейший биоинформационный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей показал, что молекула может быть идентифицирована как бутирофилиновый-аналог 8 (butyrophilin-like 8; BTNL8) зарегистрированный в базе данных NCBI как Hs.189109. Никакой информации о функции этой молекулы нами не было обнаружено в открытых источниках литературы и базах данных. Молекула BTNL8 соответствовала нуклеотидной последовательности NT 023133, локализованной на 5 хромосоме человека в позиции 5q35.3. Ген BTNL8, состоящий из 8 экзонов, достигал ~52 kb



и содержал информацию для транскрипции короткой и длинной изоформы мРНК, кодирующей трансмембранный белок 1-го типа. С использованием BLAST (basic local alignment search tool) алгоритма в базе данных NCBI для анализа экспрессии BTNL8 было определено, что мРНК, кодирующая эту молекулу, может присутствовать в различных тканях человеческого организма. С применением ПЦР с последующим секвенированием были выявлены мРНК, кодирующие обе изоформы BTNL8 в образцах тканей человеческого кишечника. Обе изоформы BTNL8 имеют идентичную нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, внеклеточную часть (состоящую из IgV и IgC доменов), гидрофобный трансмембранный регион, соответствующие экзонам 1-4 (рис. 13А). Экзоны 5-8 кодировали внутриклеточную часть молекулы BTNL8. Было также обнаружено, что 4 экзон содержит участок альтернативного сплайсинга, который обуславливает транскрипцию мРНК, кодирующую длинную форму белка BTNL8 размером 500 а.о., который содержит В30.2 фрагмент, характерный для молекул семейства бутирофилинов (рис. 13А и Б). РНК кодирующая короткую форму белка имеет участок 4-го экзона длиной 244 а.о., который приводит к изменению рамки считывания и возникновению стоп-кодона в результате чего транскрибируется белок длиной 347 а.о. без В30.2 фрагмента. Таким образом короткая форма белка BTNL8 представляет собой молекулу с характеристиками присущими членам семейства В7 (рис. 13А). Наличие В30.2 фрагмента в длинной изоформе белка BTNL8 говорит о его гомологии с другими членами семейства бутирофилинов (рис. 13А).

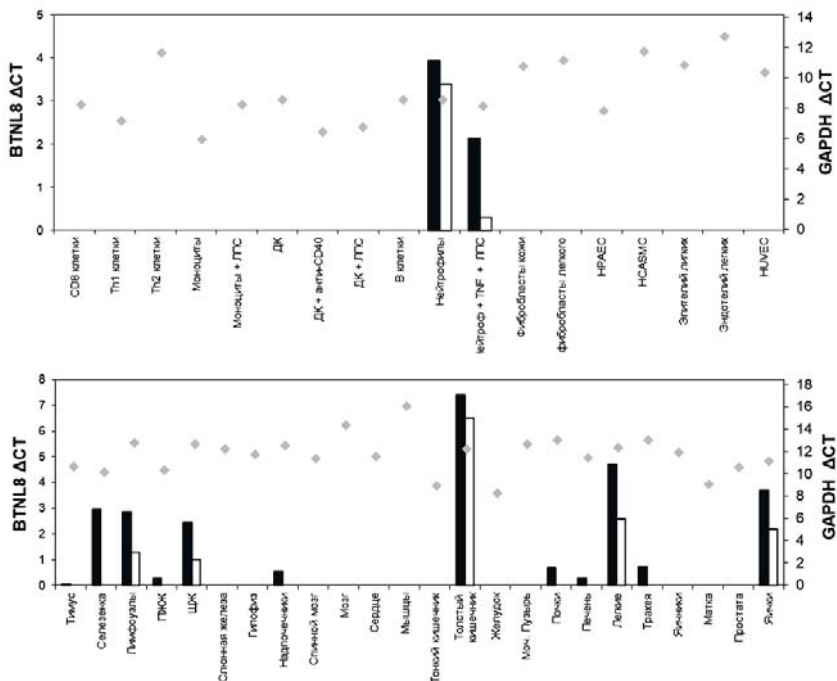


**Рисунок 13.** Сравнение аминокислотных последовательностей (А) и геномная организация (Б) двух изоформ BTNL8. Белые и заштрихованные прямоугольники обозначают кодирующие и некодирующие участки для двух изоформ BTNL8 соответственно. Цифры внутри или сверху прямоугольников обозначают количество нуклеотидов в каждом экзоне. Длина интронов указана под прямоугольниками, обозначающими экзоны

## 2. Экспрессия мРНК, кодирующей изоформы BTNL8

Для того чтобы определить клеточную и тканевую экспрессию мРНК, кодирующую обе изоформы BTNL8, использовалась ПЦР в реальном времени. Наборы праймеров и проб были разработаны для проведения ПЦР на панели кДНК, полученных из различных клеток и тканей человека (рис. 14). Все образцы кДНК были нормализованы и проверены с помощью праймеров и проб для GAPDH – гена, экспрессирующегося на постоянном уровне во всех клетках. Было обнаружено, что мРНК, кодирующие обе изоформы BTNL8, присутствуют в кишечнике, легких, семеннике, лимфоузлах и щитовидной железе. Интересно, что

В7 изоформа, но не BTN, синтезируется в селезенке. При анализе первичных клеток было обнаружено, что BTNL8 мРНК присутствует только в покоящихся нейтрофилах, но при активации с липополисахоридом TNF-а уровень BTNL8 заметно снижался.

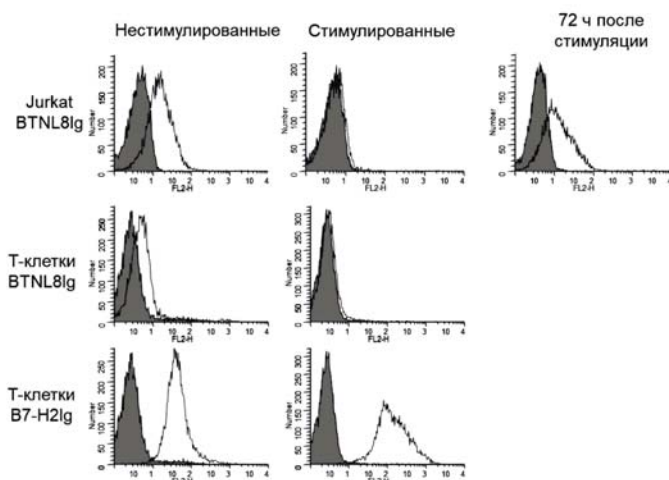


**Рисунок 14.** Анализ экспрессии BTNL8 с помощью ПЦР в реальном времени. кДНК из тканей и клеток здоровых доноров анализировали с помощью наборов праймеров и проб, специфических для двух изоформ BTNL8 (B7-подобной BTNL8 (черные столбцы), BTN-подобной BTNL8 (белые столбцы)) и GAPDH (серые ромбы). Результаты представлены в виде ΔCT (количество циклов амплификации), где  $\Delta CT = 35 - (CT \text{ эксперимента})$

### 3. Анализ экспрессии рецептора для BTNL8

Рецепторы для всех известных B7 лигандов экспрессируются на поверхности Т-лимфоцитов. Для того чтобы исследовать экспрессию рецептора, взаимодействующего с BTNL8 лигандом, были выполнены эксперименты с

использованием проточной цитометрии, где рекомбинантный химерный белок, созданный из внеклеточной части BTNL8 и Fc-домена иммуноглобулина, использовался для окраски клеток. Было показано, что BTNL8Ig взаимодействует с неактивированными Т-лимфоцитами и Jurkat Т-клеточной линией (рис. 15). Человеческие Т-лимфоциты и Jurkat клетки, активированные с ФГА или ФМА + иономицином, теряли экспрессию предполагаемого рецептора, взаимодействующего с BTNL8Ig (рис. 15). Важно отметить, что экспрессия BTNL8 рецептора также обнаруживалась на Jurkat клетках после 72 часов инкубации без активатора. Рецептор BTNL8 не был обнаружен на В-лимфоцитах, НК-клетках и моноцитах (данные не представлены). B7-H2Ig, химерный рекомбинантный белок лиганда для рецептора ICOS, использовался в качестве положительного контроля в экспериментах с использованием проточной цитометрии. B7-H2Ig взаимодействовал с покоящимися и активированными Т-лимфоцитами. Связывание B7-H2Ig с активированными клетками было значительно сильнее, чем связывание с неактивированными Т-лимфоцитами (рис. 15). С помощью ИФА было также определено, что BTNL8Ig не связывается с известными рецепторами лигандов семейства B7, такими как CD28, CTLA4, ICOS и PD-1.



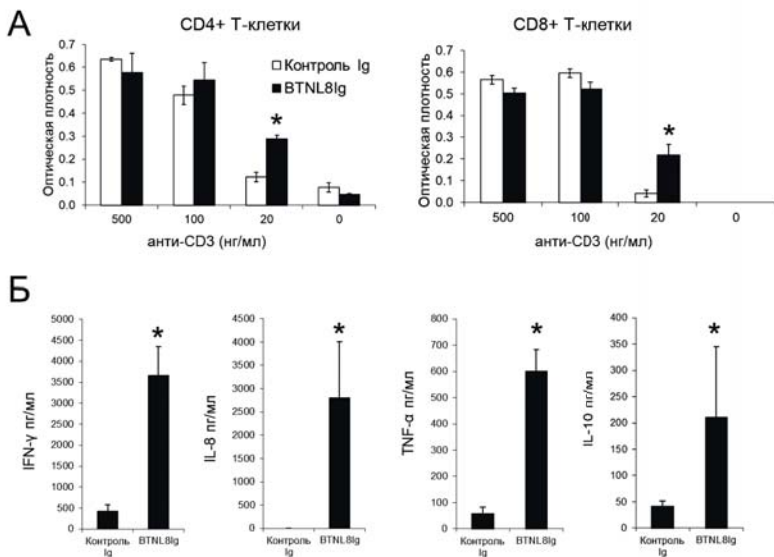
Подписи к рисунки на следующей странице

**Рисунок 15.** Экспрессия предполагаемого рецептора для BTNL8 на Т-клетках. Jurkat клетки стимулировали с ФМА + иономицин в течение 24 часов (верхние гистограммы) и окрашивали с BTNL8Ig. Свежевыделенные человеческие Т-лимфоциты стимулировались с ФГА в течение 24 часов. Клетки красились с BTNL8Ig или B7-H2Ig (белые гистограммы), контрольным Ig (серые гистограммы) с последующим добавлением антител против Fc части человеческого IgG1, конъюгированных с PE.

#### **4. Костимуляция Т-клеточной пролиферации с BTNL8 молекулой**

Так как было определено, что BTNL8 связывается с предполагаемым рецептором на Т-клетках, следующим логическим действием было изучение эффектов BTNL8 на функцию Т-лимфоцитов. Для этого CD4 и CD8 Т-лимфоциты инкубировались в 96-луночном планшете с иммобилизованными МАТ против CD3 и рекомбинантного BTNL8Ig. Было обнаружено, что BTNL8Ig рекомбинантный белок сам по себе не вызвал пролиферацию Т-лимфоцитов (рис. 16). Однако статистически значимое усиление пролиферации наблюдалось, когда CD4 и CD8 Т-лимфоциты инкубировались в присутствии субоптимальной дозы анти-CD3 МАТ (20 нг/мл) и BTNL8Ig (10 мкг/мл) по сравнению с пролиферацией Т-клеток, культивированных только с анти-CD3 МАТ или контрольным рекомбинантным Ig (рис. 16А).

Т-лимфоциты, культивируемые в присутствии BTNL8Ig, продуцировали также больше IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 и IL-10 в сравнении с Т-клетками, инкубированными в присутствии контрольных Ig (рис. 16Б). В дополнение Т-лимфоциты, культивированные с клетками 293, трансфицированными BTNL8, продуцировали в 3,5 раза больше IFN- $\gamma$  по сравнению с лимфоцитами, инкубированными с контрольными клетками 293. IL-10 был обнаружен только в супернатантах Т-клеток, культивированных в присутствии BTNL8 трансфицированных клеток. Таким образом, было показано, что BTNL8 значительно усиливает пролиферацию Т-клеток и продукцию ряда цитокинов в ответ на стимуляцию анти-CD3 или аллоантигенами.

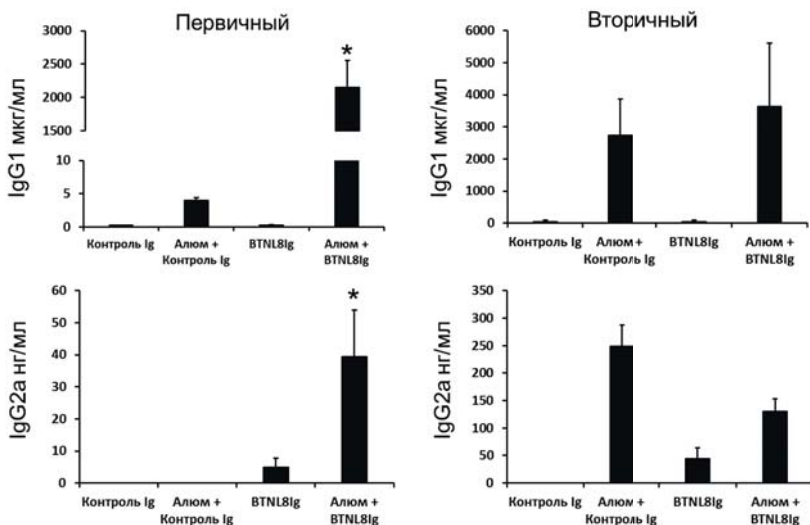


**Рисунок 16.** BTNL8 стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов. (А) Очищенные CD4+ и CD8+ Т-клетки ( $2 \times 10^5$  клеток/лунку) культивировали в 96-луночных планшетах, покрытых указанными дозами анти-CD3 МАТ и 10 мкг/мл контрольных Ig (белые столбцы) или BTNL8Ig (черные столбцы). Через 24 часа в лунки добавляли BrdU и культивировали дополнительные 24 часа. Включение BrdU во вновь синтезированную ДНК определяли с помощью специфических МАТ. Результаты представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение оптической плотности (OD, optical density) для трех лунок. Один из четырех независимых экспериментов представлен. (Б) Т-клетки, очищенные из периферической крови, культивировали в 96-луночных планшетах, покрытых анти-CD3 МАТ и контрольными Ig или BTNL8Ig. Супернатанты собирались через 24 часа. Концентрацию цитокинов в супернатантах определяли с помощью ИФА. Один из трех независимых экспериментов представлен. \* –  $p < 0,05$

## 5. BTNL8 усиливает первичный гуморальный ответ *in vivo*

Для того чтобы проверить эффект BTNL8 на иммунный ответ *in vivo*, мышам вводили внутрибрюшинно BTNL8Ig, мыши также получали внутрибрюшинную инъекцию OVA с окисью алюминия (OVA/алюм). Для оценки первичного и вторичного иммунного ответа образцы крови собирались на 16 и 30

день соответственно. Было обнаружено, что мыши, получавшие инъекцию BTNL8Ig и иммунизированные с OVA/алюм, имели увеличенный уровень анти-OVA IgG1 в сыворотке во время первичного ответа (рис. 17). Уровень антиген-специфических IgG2a не определялся в сыворотке у мышей после введения OVA/алюм и контрольного Ig. Однако 5 из 6 мышей, которые получали инъекцию BTNL8Ig и OVA/алюм, показали увеличенный уровень продукции антиген-специфических IgG2a (среднее значение = 39,4 нг/мл) при первичном ответе (рис. 17). Значительных изменений в уровне продукции OVA специфических IgG1 и IgG2a не наблюдалось в группах мышей, получавших инъекцию OVA без адьюванта, независимо от того, получали ли они инъекции BTNL8Ig или нет.



**Рисунок 17.** BTNL8 стимулирует первичный гуморальный иммунный ответ. Мышей иммунизировали с OVA±Alum. Сыворотки собирались на 14 день после первой инъекции OVA (левые диаграммы) или на 7 день после второй инъекции OVA (правые диаграммы). Уровень OVA специфических IgG разных изотипов определяли с помощью ИФА. \* –  $p > 0,05$

Как и ожидалось, уровни OVA специфических IgG1 и IgG2a были значительно выше у мышей, получавших две инъекции OVA (вторичный

иммунный ответ). Однако в отличие от первичного гуморального ответа  $\text{BTNL8Ig}$  не усиливал вторичный ответ на антиген (рис. 17). Эти результаты свидетельствуют о том, что  $\text{BTNL8}$  костимулирует первичный иммунный ответ, но не имеет эффекта на вторичный антиген-специфический гуморальный иммунитет или формирование иммунологической памяти.

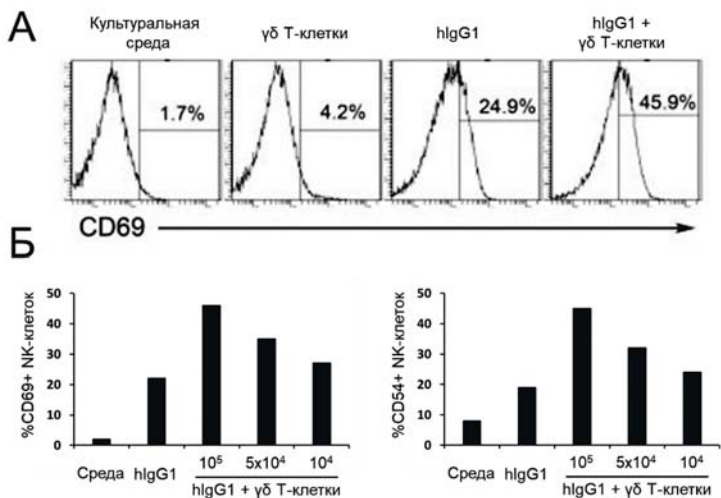
### **3. Костимуляция натурального иммунного ответа**

#### **1. Взаимодействие НК-клеток и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов**

Обычно термин костимуляция используется для объяснения усиления функциональной активности Т-лимфоцитов, когда в качестве первого сигнала выступает взаимодействие  $\text{TCR}$  и  $\text{MHC}$  с антигеном, в то время как взаимодействие между костимуляторными лигандами и их рецепторами обеспечивает оптимальную стимуляцию Т-клеточного иммунного ответа. Наши предварительные наблюдения говорят о том, что оптимальная активация НК-клеток также зависит от взаимодействия с другими клетками, что, возможно, опосредовано костимуляторными молекулами. Предварительные результаты свидетельствуют, что для активации НК-клеток  $\gamma\delta$  Т-лимфоциты играют важную роль.

Как показано на рис. 18А, инкубация НК-клеток с иммобилизованными  $\text{hIgG1}$  вызывала экспрессию  $\text{CD69}$  у 25 % клеток. Добавление *in vitro* активированных  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов увеличивало экспрессию  $\text{CD69}$  на НК-клетках до 45,9 % (рис. 18Б). Также наблюдался сходный профиль экспрессии  $\text{CD54}$ , еще одной молекулы, которая экспрессируется только на активированных НК-клетках (рис. 18Б).

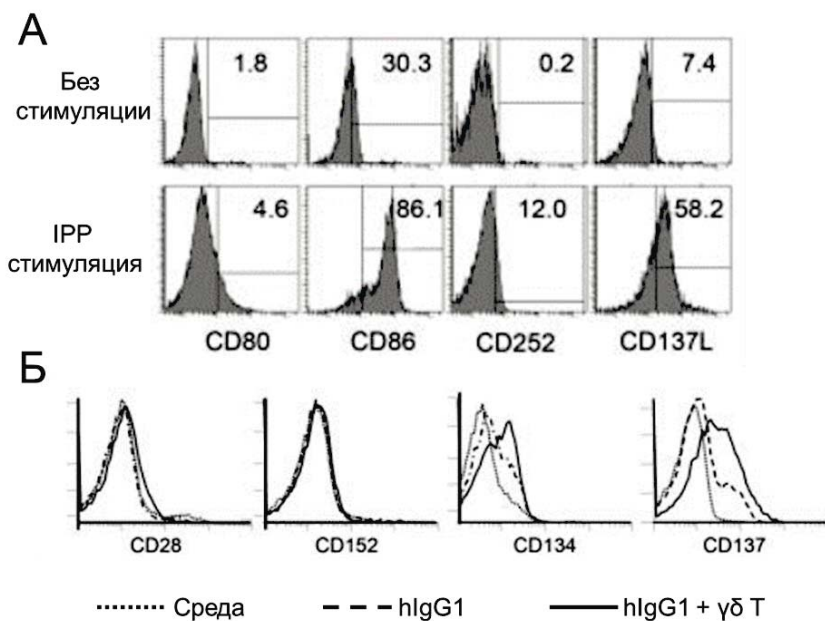




**Рисунок 18.** Прайминг NK-клеток с иммобилизованным hIgG1 и костимуляция в присутствии  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов. (А) Очищенные NK-клетки ( $2 \times 10^5$  клетки/лунку) культивировали с иммобилизованными hIgG1 и (или) с  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитами (в указанных концентрациях), активированных *in vitro* в присутствии IPP и IL-2. Уровень экспрессии CD69 и CD54 на гейтированных CD3-CD56+ NK-клетках определяли с помощью проточной цитометрии

## 2. Роль CD137 и CD137L взаимодействия в активации NK-клеток

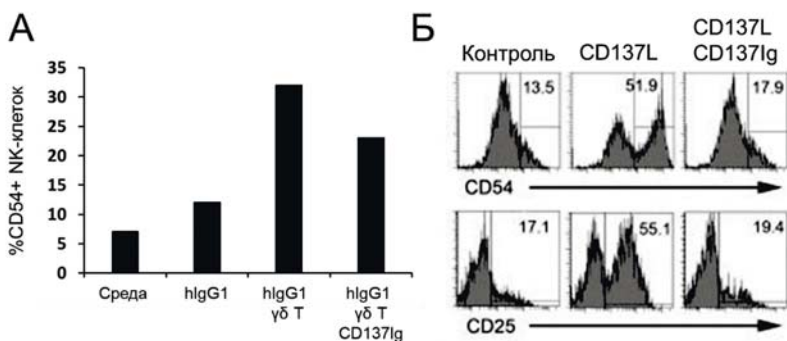
Известно, что лиганды В7 и TNF семейств необходимы для оптимальной стимуляции клеток иммунной системы (Croft, 2014; Chen and Flies, 2013). На рис. 19А показано, что нестимулированные  $\gamma\delta$  Т-лимфоциты не экспрессируют В7-1, В7-2, OX40L или CD137L. Одиноко после стимуляции с IPP *in vitro*  $\gamma\delta$  Т-лимфоциты экспрессируют В7-1 (86 %), OX40L (12 %) и CD137L (58 %). NK-клетки экспрессируют OX40 и CD137 после IgG1 прайминга, и экспрессия этих молекул была увеличена в присутствии  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов (рис. 19Б). Экспрессии CD28 и CTLA-4 на поверхности NK-клеток не обнаружено даже после инкубации с  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитами (рис. 19Б). ICOS и PD-1 также не были обнаружены на поверхности NK-клеток (данные не представлены).



**Рисунок 19.**  $\gamma\delta$  Т-лимфоциты экспрессируют костимуляторные лиганды, а НК-клетки экспрессируют рецепторы. (А) Свежевыделенные или активированные  $\gamma\delta$  Т-лимфоциты были окрашены с МАТ против В7-1 (CD80), В7-2 (CD86), ОХ40L (CD252) и 41ВВL (CD137L). Экспрессия лигандов на гейтированных CD3+  $\gamma\delta$  TCR+ клетках показана. (Б) НК-клетки, культивированные с различными стимуляторами или без стимуляторов, были окрашены с МАТ против CD28, СТLА-4 (CD152), ОХ40 (CD134) и 4-1ВВ (CD137). Гистограммы гейтированных CD3-CD56+ НК-клеток показаны

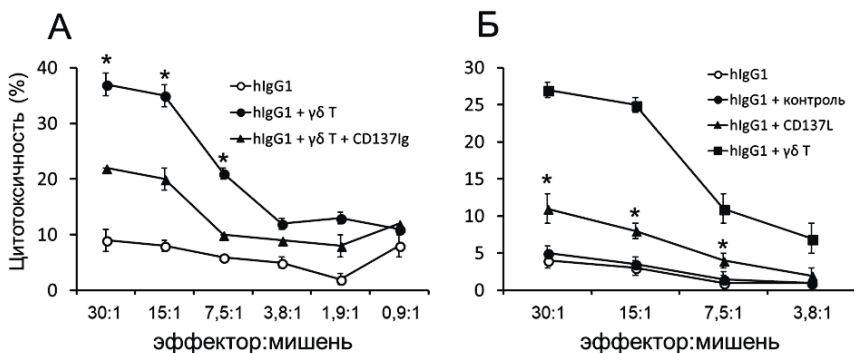
Тот факт, что при стимуляции НК-клеток увеличивается экспрессия CD137 и ОХ40, костимуляторных рецепторов, дало нам основание предположить, что эти молекулы могут участвовать в усилении противоопухолевого иммунного ответа, опосредованного НК-клетками. Для проверки этой гипотезы были использованы рекомбинантные химерные белки CD137Ig и ОХ40Ig, которые блокируют связывание соответствующих костимуляторных молекул. Добавление в культуру клеток СТLА-4Ig (использованного в качестве отрицательного контроля) не ингибировало активацию НК-клеток в присутствии  $\gamma\delta$  Т-

лимфоцитов (результаты не представлены). Однако CD137Ig частично ингибирова́л экспрессию CD54 на поверхности NK-клеток (рис. 20А). Эти результаты говорят о том, что CD137 участвует в активации NK-клеток  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитами. Подобные результаты были получены при использовании P815 клеток трансфицированными CD137L (рис. 20Б). Эти данные свидетельствуют, что CD137/CD137L взаимодействие, по крайней мере частично, вовлечено в активацию NK-клеток  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитами.



**Рисунок 20.** Блокирование CD137L снижает активацию NK-клеток в присутствии  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов. (А) NK-клетки культивировались с активированными  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитами в присутствии CD137Ig химерного рекомбинантного белка или без. (Б) NK-клетки культивировались с P815 клетками, трансфицированными CD137L или контрольными P815 в присутствии CD137Ig химерного рекомбинантного белка или без. После 48 часов культивирования экспрессию CD54 и CD25 на CD3-CD56+ NK-клетках анализировали с помощью проточной цитометрии

Результаты, представленные на рис. 21, показывают, что NK-клетки после прайминга с иммобилизованными hlgG1 не проявляют цитолитической активности, в то время как добавление  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов значительно усиливало NK-опосредованный лизис опухолевых клеток (рис. 21). Добавление CD137Ig в культуру NK и  $\gamma\delta$  Т-клеток снижало цитотоксическую активность NK-клеток на 40 %. Это говорит о том, что 4-1BB вовлечен в регуляцию противоопухолевой функции NK-клеток.

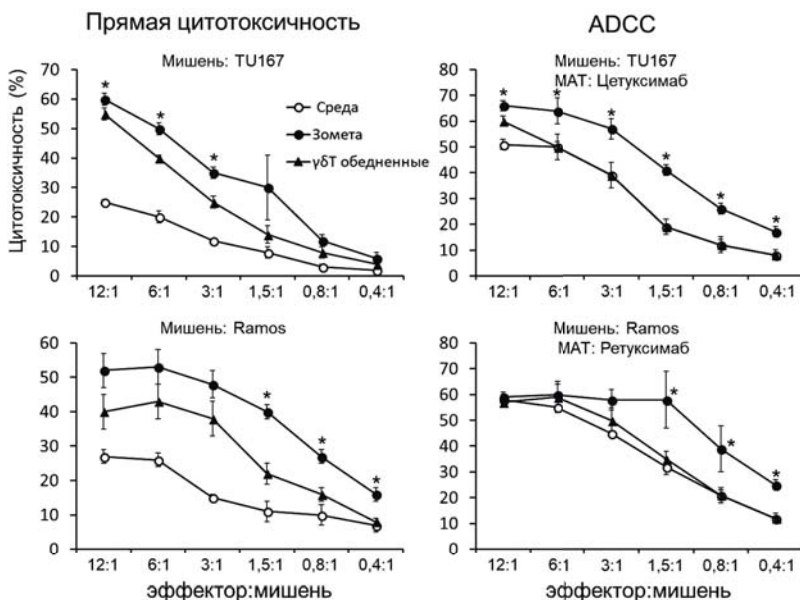


**Рисунок 21.** CD137 регулирует цитотоксическую активность NK-клеток. (А) Рекombинантный химерный протеин 4-1BBIg добавляли в культуру NK и  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов. (Б) NK-клетки культивировали с контрольными P815 клетками или P815 клетками, экспрессирующими CD137L. В некоторые культуры добавляли CD137Ig. После 48 ч инкубации NK-клетки очищали и анализировали цитотоксичность. \* –  $P > 0,05$  по сравнению с hIgG1 контроль

### 3. Эффект препаратов, применяемых в клиниках, на активацию NK-клеток

Для того чтобы изучить возможность применения клинических препаратов для активации NK-клеток и  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов, в следующих экспериментах были использованы ритуксимаб; МАТ, распознающие CD20 и используемые для терапии В-клеточной лимфомы; цетуксимаб; МАТ, распознающие Her2 и используемые для терапии Her2+ опухолей молочной железы, и зомета (zoledronic acid), бисфосфонат, используемый в клиниках для лечения онкологических больных и индуцирующий активацию  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов. Как показано на рис. 22, инкубация МКПК с Зомета значительно усиливала прямую цитолитическую активность NK-клеток против SCCHN (TU167) и В-клеточной лимфомы (Ramos) мишеней. Важно отметить, что удаление  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов перед началом культивирования значительно снижало прямую цитотоксическую активность NK-клеток.

Как и ожидалось, более высокий уровень НК-опосредованной цитотоксичности против TU167 (Her2+) и Ramos (CD20+) наблюдался в присутствии специфических антител (цетуксимаб и ритуксимаб соответственно). Однако культивирование МКПК с зомета значительно увеличивало АЗКЦ. Более того, удаление  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов перед началом культивирования с зомета снижало уровень НК цитотоксичности до уровня, который наблюдался, когда МКПК культивировались без зометы (рис. 22). Это наблюдение говорит о том, что  $\gamma\delta$  Т-лимфоциты необходимы для активации цитотоксичности НК-клеток в присутствии зомета. В целом эти результаты доказывают физиологическую и клиническую значимость  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов, экспрессии 4-1BB в активации прямой и антителозависимой НК цитотоксичности.



**Рисунок 22.** Зомета усиливает прямую и антителозависимую НК цитотоксичность. МКПК культивировались со средой или зомета. В некоторых группах  $\gamma\delta$  Т-лимфоциты удаляли перед началом культивирования. Через 96 часов НК-клетки выделяли из клеточных культур и определяли цитотоксическую активность. \* –  $P > 0,05$  по сравнению с цитотоксичностью НК-клеток, выделенных из популяции МКПК, из которых удалили  $\gamma\delta$  Т-лимфоциты

## ВЫВОДЫ

1. Выявлены новые молекулы В7-Н3 и BTNL8, обладающие уникальными иммунологическими свойствами, расширяющими наши представления об участии костимуляторных молекул в регуляции иммунного ответа. Результаты работы позволили предложить новые стратегии для таргетной иммунотерапии онкологических заболеваний, основанные на распознавании новых молекул моноклональными антителами, а также блокировки их функциональной активности.
2. Для анализа функциональной активности исследуемых молекул получены рекомбинантные белки В7-Н3Ig и BTNL8Ig, ряд опухолевых клеточных линий, трансфицированных плазмидами, кодирующими эти костимуляторные молекулы, а также специфические моноклональные антитела.
3. Показано, что молекула В7-Н3, которая имеет аминокислотную гомологию с В7-1, В7-2, В7-Н1 и В7-Н2, что определяет ее принадлежность к семейству В7. Выяснено, что В7-Н3 лиганд экспрессируется на поверхности антигенпрезентирующих клеток, а его рецептор – на поверхности Т-лимфоцитов. Взаимодействие В7-Н3 с предполагаемым рецептором вызывает повышение продукции IFN- $\gamma$  и усиливает генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов.
4. Экспрессия В7-Н3 на поверхности опухолевых клеток приводит к их отторжению и развитию долговременной иммунологической памяти против опухолевых антигенов.
5. Выявлено, что внеклеточная часть BTNL8 имеет аминокислотную последовательность, гомологичную известным В7 молекулам, в то время как цитоплазматическая часть молекулы содержит В30.2 домен, который характерен молекулам, принадлежащих к семейству бутирофилинов.

6. Впервые показано, что BTNL8 способна стимулировать пролиферацию и продукцию INF- $\gamma$ , IL-8, IL-10 и TNF- $\alpha$  Т-лимфоцитами. Введение мышам рекомбинантного белка BTNL8Ig усиливает продукцию антиген-специфических IgG1 и IgG2a во время первичного, но не вторичного иммунного ответа.
7. Продемонстрирована ранее не известная функция  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов индуцировать НК-опосредованный лизис опухолевых клеток. Показано, что для оптимальной активации НК-клеток, подобно активации Т-лимфоцитов, требуются два сигнала: первый обеспечивается Fc-рецептором, второй – костимуляторными молекулами, в частности CD137.

## **ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Одним из самых важных и интересных направлений развития исследований функциональной активности B7-H3 и BTNL8 лигандов является поиск их специфических рецепторов. Обнаружение рецепторов и развитие молекулярных инструментов для управления костимуляцией может позволить разработать новые стратегии для терапии аутоиммунных заболеваний и иммунотерапии рака. Костимуляторные молекулы могут также помочь повысить эффективность существующих вакцин через усиление положительных сигналов и блокировку ингибирующих путей. Использование B7-H3 поможет увеличить продукцию Th1 цитокинов, которые необходимы для дифференциации и активации Т-клеточного иммунитета. Стимуляция с применением BTNL8 лиганда может обеспечить значительную активацию первичного иммунного ответа.

Агенты, активирующие  $\gamma\delta$  Т-лимфоциты, такие как бисфосфонаты (Зомета), которые в настоящее время применяются в клиниках, могут быть использованы в качестве иммуномодулирующих препаратов для усиления естественного иммунного ответа против опухолей. Комбинирование таких препаратов с моноклональными антителами, также применяемыми в клиниках (Цетуксимаб и

Ритуксимаб), может улучшить иммунотерапию рака через активацию адаптивного и естественного иммунитета.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Подлесных С.В., Шаньшин Д.В., Колосова Е.А., Мурашкин Д.Е., Шапрова О.Н., Щербаков Д.Н., **Шаповал А.И.** Разработка стратегии поиска пептидных блокаторов белков в составе молекулярных точек контроля иммунного ответа // Биоорганическая химия. – 2018. – Т. 44. – № 2. – С. 138–145.
2. **Шаповал А.И.**, Подлесных С.В., Колосова Е.А., Щербаков Д.Н. Новые точки контроля иммунного ответа для иммунотерапии онкологических заболеваний // Российский онкологический журнал. – 2017. – Т. 22. – № 4. – С. 175–179.
3. Sallin M.A., Zhang X., So E.C., Burch E., Cai L., Lin W., **Chapoval A.I.**, Strome S.E. The anti-lymphoma activities of anti-CD137 monoclonal antibodies are enhanced in FcγRIII<sup>-/-</sup> mice // Cancer Immunology, Immunotherapy. – 2014. – V. 63. – № 9. – P. 947–958.
4. **Chapoval A.I.**, Smithson G., Brunick L., Mesri M., Boldog F.L., Andrew D., Khramtsov N.V., Feshchenko E.A., Starling G.C., Mezes P.S. BTNL8, a butyrophilin-like molecule that costimulates the primary immune response // Molecular Immunology. – 2013. – V. 56. – № 4. – P. 819–828.
5. Maniar A., Zhang X., Lin W., Gastman B.R., Pauza C.D., Strome S.E., **Chapoval A.I.** Human  $\gamma\delta$  T lymphocytes induce robust NK cell mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement // Blood. – 2010. – V. 116. – P. 1726–1733.
6. Urban E.M., **Chapoval A.I.**, Pauza C.D. Repertoire development and the control of cytotoxic/effector function in human  $\gamma\delta$  T cells // Clinical and Developmental Immunology. – 2010. – 732893.



7. Zhang X., Voskens C.J., Sallin M., Maniar A., Montes C.L., Zhang Y., Lin W., Li G., Burch E., Tan M., Hertzano R., **Chapoval A.I.**, Tamada K., Gastman B.R., Schulze D.H., Strome S.E. CD137 promotes proliferation and survival of human B cells // *Journal of Immunology*. – 2010. – V. 184. – P. 787–795.
8. Alexander A.A.Z., Maniar A., Cummings J.-S., Hebbeler A.M., Schulze D.H., Gastman B.R., Pauza C.D., Strome S.E., **Chapoval A.I.** Isopentenyl pyrophosphate activated CD56+  $\gamma\delta$  T lymphocytes display potent anti-tumor activity towards human squamous cell carcinoma // *Clinical Cancer Research*. – 2008. – V. 14. – P. 4232–4240.
9. Mesri M., Smithson G., Ghatpande A., **Chapoval A.I.**, Shenoy S., Boldog F., Hackett C., Pena C.E., Burgess C., Bendele A., Shimkets R.A., Starling G.C. Related Articles, Links Inhibition of in vitro and in vivo T cell responses by recombinant human Tim-1 extracellular domain proteins // *International Immunology*. – 2006. – V. 18. – P. 473–484.
10. Luo L., **Chapoval A.I.**, Flies D.B., Zhu G., Hirano F., Wang S., Lau J.S., Dong H., Tamada K., Flies A.S., Liu Y., Chen L. B7-H3 Enhances Tumor Immunity In Vivo by Costimulating Rapid Clonal Expansion of Antigen-Specific CD8+ Cytolytic T Cells // *Journal of Immunology*. – 2004. – V. 173. – P. 5445–5450.
11. Wilcox R.A., Tamada K., Flies D.B., Zhu G., **Chapoval A.I.**, Blazar B.R., Kast W.M., Chen L. Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8+ cytolytic T lymphocytes in vivo // *Blood*. – 2003. – V. 103. – P. 177–184.
12. Sica G.L., Choi I.-H., Zhu G., Tamada K., Wang S.-D., Tamura H., **Chapoval A.I.**, Flies D.B., Bajorath J., Chen L. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell Immunity // *Immunity*. – 2003. – V. 18. – P. 849–861.
13. **Chapoval A.I.**, Zhu G., Chen L. Immunoglobulin fusion protein as a tool for evaluation of T-cell costimulatory molecules // *Molecular Biotechnology*. – 2002. – V. 21. – P. 259–264.
14. Strome S.E., Voss S., Wilcox R., Wakefield T.L., Tamada K., Flies D., **Chapoval A.I.**, Lu J., Kasperbauer J.L., Padley D., Vile R., Gastineau D., Wettstein

- P., Chen L. Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response // *Cancer Research*. – 2002. – V. 62. – P. 1884–1889.
15. Wilcox R.A., **Chapoval A.I.**, Gorski K.S., Otsuji M., Shin T., Flies D.B., Tamada K., Mittler R.S., Tsuchiya H., Pardoll D.M., Chen L. Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells // *Journal of Immunology*. – 2002. – V. 168. – P. 4262–4267.
16. Wilcox R.A., Flies D.B., Zhu G., Johnson A.J., Tamada K., **Chapoval A.I.**, Strome S.E., Pease L.R., Chen L. Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors // *Journal of Clinical Investigation*. – 2002. – V. 109. – P. 651–659.
17. **Chapoval A.I.**, Ni J., Lau J.S., Wilcox R.A., Flies D.B., Liu D., Dong H., Sica G.L., Zhu G., Tamada K., Chen L. B7-H3: a costimulatory molecule for T-cell activation and IFN- $\gamma$  production // *Nature Immunology*. – 2001. – V. 2. – P. 269–274.
18. Liu Y., McMinimy D.L., Savinov A.Y., Johnson K.A., Kremlev S.G., Wang S.D., Zhu G., **Chapoval A.I.**, Dong H., Tamada K., Ni J., Chen L. Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS // *Blood*. – 2000. – V. 96. – P. 2808–2813.
19. Strome S.E., Martin B., Flies D.B., Tamada K., **Chapoval A.I.**, Shu S., Chen L. Enhanced therapeutical potential of adoptive immunotherapy by in vitro CD28/CD137 costimulation of tumor reactive T cells against a poor immunogenic MHC Class I-negative A9P melanoma // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2000. – V. 23. – P. 430–437.
20. Tamada K., Shimozaki K., **Chapoval A.I.**, Zhai Y., Su J., Chen S.F., Hsieh S.L., Nagata S., Ni J., Chen L. LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response // *Journal of Immunology*. – 2000. – V. 164. – P. 4105–4110.
21. Tamada K., Shimozaki K., **Chapoval A.I.**, Zhu.G., Sica G., Flies D., Boone T., Hsu H., Fu Y.X., Nagata S., Ni J., Chen L. Modulation of T cell-mediated immunity in tumor and graft versus host disease models through LIGHT costimulatory pathway // *Nature Medicine*. – 2000. – V. 6. – P. 283–289.

### **Монографии и главы в книгах**

1. **Chapoval A.I.**, Schulze D.H., Strome S.E. Immunotherapy for Head and Neck Cancer. In Ballenger's Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. People's Medical Publishing House. 2009.
2. **Chapoval A.I.**, Chen L. B7-H3. in The B7-CD28 family Molecules. Eureka. 2003.
3. **Chapoval A. I.**, Zhu G., Chen L. Immunoglobulin fusion protein as a tool for evaluation of T-cell costimulatory molecules // Methods in Molecular Medicine. – 2000. – V. 45. – P. 247–255.