

МОНОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ПРОАПОПТОТИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ К Аро2L/TRAIL И ПОВЫШАЕТ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К TRAIL-ИНДУЦИРОВАННОМУ АПОПТОЗУ

© 2019 г. Я.В. Евстратова, М.И. Кобякова, В.В. Новикова*, А.С. Сенотов, В.С. Акатов, Р.С. Фадеев

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 3*

**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1*

Поступила в редакцию 10.07.2019 г.

После доработки 10.07.2019 г.

Принята к публикации 19.07.2019 г.

Проведено сравнительное исследование экспрессии про- и антиапоптотических рецепторов к цитокину TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) на незрелых бластных клетках острого миелоидного лейкоза, на клетках острого миелоидного лейкоза, дифференцированных в моноцито- и макрофагоподобные клетки, и на нормальных моноцитах и макрофагах. Было показано, что снижение экспрессии проапоптотических рецепторов к TRAIL и приобретение устойчивости к TRAIL-индуцированному апоптозу происходит не только при дифференцировке клеток острого миелоидного лейкоза в моноцито- и макрофагоподобные клетки, но и при созревании нормальных моноцитов в макрофаги. Таким образом, дифференцировка как клеток острого миелоидного лейкоза, так и нормальных миелоидных клеток в моноцитарно-макрофагальном направлении опосредует снижение экспрессии проапоптотических рецепторов к TRAIL, что в свою очередь может определять устойчивость нормальных миелоидных клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, цитокин TRAIL, дифференцировка, резистентность.

DOI: 10.1134/S0006302919050107

Цитокин Аро2L/TRAIL или TNFSF10 – белок семейства фактора некроза опухолей – является одним из основных молекулярных эффекторов противоопухолевого иммунитета. Экспрессия TRAIL показана для NK-клеток, CD8+ Т-клеток и дендритных клеток. TRAIL является лигандом для рецепторов TRAIL-R1 (DR4) и TRAIL-R2 (DR5), при связывании с которыми запускается апоптоз в клетке-мишени [1–3]. Кроме того, активность цитокина TRAIL регулируется рецепторами-ловушками TRAIL-R3 (DcR1) и TRAIL-R4 (DcR2). TRAIL-R3 связывает TRAIL, но не способен вызывать апоптоз из-за отсутствия цитоплазматического домена смерти, однако TRAIL-R4 может запускать антиапоптотическую программу благодаря наличию дефектного DD-мотива в трансмембранном домене [4]. Первоначально было обнаружено, что опухолевые

клетки обладают повышенной чувствительностью к TRAIL по сравнению с нормальными клетками, главным образом из-за низкой экспрессии DcR1 и DcR2 – рецепторов ловушек, и большей представленности DR4 и DR5 – проапоптотических TRAIL-рецепторов [5,6]. Опухолевые клетки являются бластными незрелыми клеточными формами, именно на них главным образом направлено действие противоопухолевого иммунитета, так как вероятность злокачественной трансформации бластных пролиферирующих клеток несоизмеримо выше, чем дифференцированных высокоспециализированных неделящихся клеток. Исходя из этого, возникает предположение о роли дифференцировки и/или созревания клеток в чувствительности к TRAIL-индуцированному апоптозу. Так как баланс про- и антиапоптотических рецепторов к TRAIL может играть ключевую роль в чувствительности клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу, возможно, изменение экспрессии TRAIL-рецепторов в процессе дифференцировки может

Сокращения: TRAIL – цитокин семейства факторов некроза опухоли (TNF-related apoptosis-inducing ligand), ATRA – транс-ретиноевая кислота, PMA – фобол-12-миристан-13-ацетат.

определять чувствительность клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу.

Данное исследование было направлено на изучение экспрессии рецепторов к TRAIL, и, следовательно, чувствительности к TRAIL-индуцированному апоптозу клеток острого миелоидного лейкоза при дифференцировке в моноцитарно-макрофагальном направлении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белка izTRAIL. Рекомбинантный белок izTRAIL человека получали по методике, описанной в работе [7].

Клеточные культуры. В качестве объекта исследования в работе использовали клетки острого миелоидного лейкоза человека THP-1, полученные из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки THP-1 (далее THP-1wt) культивировали в среде RPMI 1640/F12 (Sigma, США) с добавлением 20%-й эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 80 мкг/мл гентамицина сульфата (Sigma, США), 20 мкг/мл дифлюкана (Pfizer, США) при 37°C, в условиях 5%-го содержания CO₂ в воздухе. Моноцитоподобные клетки получали с помощью обработки клеток ретиноевой кислотой (ATRA). Для этого клетки THP-1wt культивировали в среде RPMI/F12 с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки в присутствии 1 мкМ ATRA (Sigma, США) в течение 96 ч. Макрофагоподобные клетки THP-1PMA получали с помощью обработки форбол-12-мири-стат-13-ацетатом (PMA). Для этого клетки THP-1wt культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки в присутствии 200 нМ PMA (Sigma, США) в течение 96 ч. Моноциты были получены из мононуклеарной фракции периферической крови человека с использованием набора MojoSort Human Pan Monocyte Isolation Kit (BioLegend, США), в соответствии с рекомендациями производителя. Макрофаги получали из моноцитов периферической крови человека. Для получения макрофагов моноциты высевали на культуральный пластик и инкубировали в течение семи суток в среде DMEM/F12 с 2% фетальной бычьей сыворотки.

Анализ экспрессии рецепторов к TRAIL. Для проведения анализа клетки собирали с культуральных флаконов и центрифугировали в Cell Staining Buffer (BioLegend, США) при 300 g в течение 5 мин. Окрашивание проводили с использованием моноклональных антител PE anti-human TRAIL-R1 (CD261) (BD Bioscience, США), PE anti-human CD262 (TRAIL-R2) (Biolegend, США), Alexa Fluor 647 Anti-human CD263 (TRAIL-R3) (BD Bioscience, США), PE anti-hu-

man CD264 (TRAIL-R4) (Biolegend, США). Для определения неспецифического связывания клетки окрашивали соответствующими контрольными изотипами антител. Окрашивание проводили при комнатной температуре в темноте, в течение 30 мин. После окрашивания клетки фиксировали 2%-м раствором параформальдегида. Анализ экспрессии проводили при помощи проточного цитометра Accuri C6 (BD Bioscience, США).

Анализ жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток после инкубации с izTRAIL оценивали по интенсивности восстановления резазурина (Sigma, США). Для этого к клеткам после инкубации с izTRAIL добавляли резазурин в концентрации 30 мкг/мл. Далее клетки инкубировали с красителем в течение 4 ч при 37°C в условиях 5%-го содержания CO₂ в воздухе и измеряли интенсивность флуоресценции при длине волны возбуждения 532 нм и длине волны испускания 590 нм с использованием планшетного спектрофлюориметра Infinite F200 (Tecan, Австрия). Все измерения проводили относительно контрольных клеток, необработанных izTRAIL.

Статистический анализ. Результаты представляли в виде среднего \pm стандартная ошибка ($M \pm SEM$). Все опыты проводили не менее чем в пяти повторностях ($n \geq 5$). Статистическую значимость отличий определяли с использованием критерия Уилкоксона—Манна.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Снижение экспрессии рецепторов к TRAIL происходит на фоне дифференцировки в моноцитарно-макрофагальном направлении. Было показано отсутствие экспрессии антиапоптотических рецепторов (DcR1 и DcR2) к TRAIL у всех исследуемых типов клеток. Для THP-1wt наблюдался самый большой процент клеток, несущих проапоптотические рецепторы DR4 и DR5 — $65 \pm 2\%$ и $71 \pm 8\%$ соответственно. После обработки клеток ATRA наблюдалось снижение количества клеток, экспрессирующих проапоптотические рецепторы DR4 и DR5, до $15 \pm 9\%$ и $12 \pm 2\%$ соответственно. При дифференцировке клеток острого миелоидного лейкоза в макрофагоподобные клетки с помощью PMA происходила полная потеря экспрессии проапоптотического рецептора DR4 и снижение количества клеток, несущих DR5 до $30 \pm 3\%$. У моноцитов периферической крови экспрессия проапоптотического рецептора DR4 отсутствовала, количество клеток, несущих проапоптотический рецептор DR5, составляло $19 \pm 7\%$. Для макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови, показано отсутствие экспрессии обоих проапоптотических рецепторов (таблица).

Таблица 1. Анализ экспрессии рецепторов к TRAIL у клеток THP-1wt, THP-1ATRA, THP-1PMA, моноцитов и макрофагов

	DR4, %	DR5, %	DcR1, %	DcR2, %
THP-1wt	65 ± 2	71 ± 8	—	—
THP-1ATRA	15 ± 9	12 ± 2	—	—
THP-1PMA	—	30 ± 3	—	—
Моноциты	—	19 ± 7	—	—
Макрофаги	—	—	—	—

Примечание. Представлены данные (в процентах) о доле клеток, несущих данный рецептор, от общего числа клеток.

Повышение устойчивости клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу происходит на фоне понижения экспрессии проапоптотических рецепторов к TRAIL. Полученные данные по анализу экспрессии рецепторов к TRAIL согласуются с анализом цитотоксического действия *iz*TRAIL на исследуемые типы клеток. Было показано, что 82 ± 6% клеток THP-1wt чувствительны к *iz*TRAIL. Также было показано, что только 15 ± 3% как моноцитоподобных клеток THP-1ATRA, так и макрофагоподобных клеток THP-1PMA были чувствительны к действию *iz*TRAIL. Моноциты периферической крови и макрофаги были резистентными к TRAIL-индуцированному апоптозу (рисунок).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, снижение экспрессии проапоптотических рецепторов к TRAIL и, соответственно, повышение устойчивости к TRAIL-индуцированному апоптозу происходит на фоне дифференцировки миелоидных клеток в моноцитарно-макрофагальном направлении, как при на-

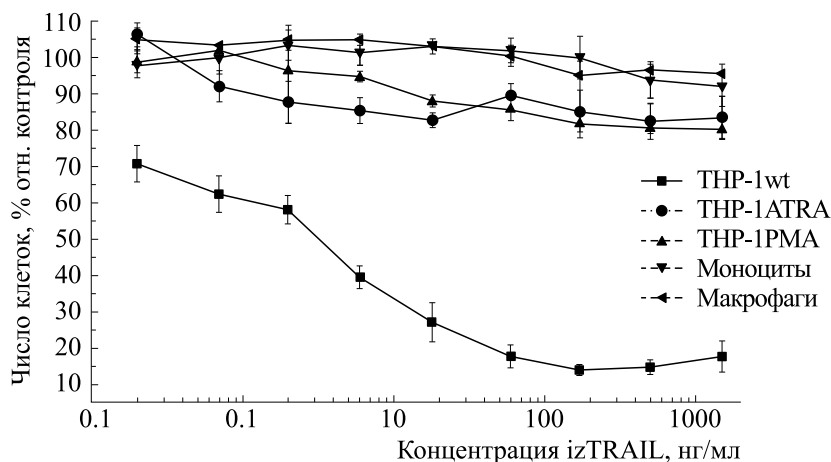
правленной дифференцировке лейкозных бластов, так и при созревании нормальных моноцитов периферической крови в макрофаги. Следовательно, модулирование экспрессии проапоптотических рецепторов к TRAIL может являться одним из основных механизмов чувствительности бластных клеток острого миелоидного лейкоза и устойчивости нормальных зрелых миелоидных клеток (моноцитов и макрофагов) к TRAIL-индуцированному апоптозу, как одному из основных эффекторов противоопухолевого иммунитета.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при использовании приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке стипендиального гранта Президента РФ (СП-606.2019.4, СП-608.2019.4).



Цитотоксическое действие рекомбинантного белка *iz*TRAIL на клетки THP-1wt, THP-1ATRA, THP-1PMA, моноциты и макрофаги.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y. Hayakawa, V. Screpanti, H. Yagita, et al., *J. Immunol.* **172** (1), 123 (2004).
2. E. M. Janssen, N. M. Droin, E. E. Lemmens, et al., *Nature* **434** (7029), 88 (2005).
3. M. J. Smyth, K. Takeda, Y. Hayakawa, et al., *Immunity* **18** (1), 1 (2003).
4. F. Christina, H. E. Christoph, G. Bjorn, et al., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 1462 (2007)
5. D. Lawrence, Z. Shahrokh, S. Marsters, et al., *Nat. Med.* **7**, 383 (2001).
6. A. Ashkenazi, R.C. Pai, S. Fong, et al., *J. Clin. Invest.* **104**, 155 (1999).
7. Р. С. Фадеев, А. В. Чеканов, Н. В. Долгих и др., *Биол. мембраны: журн. мембранной и клеточной биологии* **29** (6), 433 (2012).

Monocyte-Macrophage Differentiation Suppresses the Expression of Proapoptotic Receptors to Apo2L/TRAIL and Increases Resistance to TRAIL-Induced Apoptosis

Y.V. Evstratova*, M.I. Kobayakova* V.V. Novikova**, A.S. Senotov*, V.S. Akatov*, and R.S. Fadeev*

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Puschino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia*

In this study we compared the expression of pro- and anti-apoptotic receptors to the cytokine TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) on immature blast acute myeloid leukemia cells, on acute myeloid leukemia cells differentiated into monocyte- and macrophage-like cells, and on normal monocytes and macrophages. It was shown that a decrease in the expression of proapoptotic receptors to TRAIL and acquired resistance to TRAIL-induced apoptosis occur not only when acute myeloid leukemia cells differentiate into monocyte- and macrophage-like cells, but also when normal monocytes mature into macrophages. Thus, the differentiation of both acute myeloid leukemia cells and normal myeloid cells in the monocyte-macrophage direction mediates a decrease in the expression of proapoptotic receptors to TRAIL, which in turn can determine the resistance of normal myeloid cells to TRAIL-induced apoptosis.

Keywords: acute myeloid leukemia, cytokine TRAIL, differentiation, resistance