

IN SILICO АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ К МИНОРНОМУ АНТИГЕНУ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ НА-2

© 2019 г. С. А. Шитиков^{1,2*}, А. А. Кучмий¹, Н. А. Быкова¹,
С. Ю. Филькин¹, Д. С. Романюк¹, Г. А. Ефимов^{1,2}

*E-mail: sheetikov.s@blood.ru

¹ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения РФ, Лаборатория трансплантационной иммунологии, Москва, Россия;

²Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Поступила: 25.12.2018. Принята: 21.01.2019

Трансплантация гемопоэтических клеток (ТГСК) от родственного или неродственного донора применяется при терапии опухолей кроветворной системы. Однако, при трансплантации развивается иммунный ответ клеток донора на антигены реципиента. Ответ на здоровые ткани называется реакцией «трансплантат против хозяина» (РТПХ), а ответ на гемопоэтическую ткань в контексте гемобластоza, называется реакцией «трансплантат против опухоли» (РТПО). Развитие РТПО является благоприятным последствием трансплантации, поскольку данная реакция элиминирует остаточные опухолевые клетки и предотвращает рецидив. Было показано, что иммунный ответ возникает на полиморфные пептиды, презентируемые в составе молекул главного комплекса гистосовместимости (HLA). Такие пептиды являются результатом протеасомной деградации белков, кодируемых генами, содержащими несинонимичные однонуклеотидные полиморфизмы, и называются минорными антигенами гистосовместимости (МАГ). Изучение структуры репертуаров Т-клеточных рецепторов (ТКР), распознающих МАГ, может помочь в идентификации механизмов формирования аллореактивного ответа и является важным для предсказания антигена аллореактивных клонов с неустановленной специфичностью. В данной статье были определены и проанализированы *in silico* генетические последовательности, кодирующие Т-клеточные рецепторы, специфичные к минорному антигену НА-2. Нами было обнаружено преимущественное использование V21 и J42 сегментов α -цепи при формировании CDR3 участка и присутствие V7-8 сегмента в большинстве CDR3 участков β -цепи, что указывает на существование консервативного мотива, ответственного за распознавание антигена НА-2.

Ключевые слова: РТПХ, РТПО, ТГСК, Т-клеточные рецепторы, минорные антигены гистосовместимости, аллореактивный ответ

DOI: 10.31857/S102872210005018-4

Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский пр., д. 4, ФГБУ НМИЦ Минздрава России, Шитиков Савелий Андреевич. Тел.: +7(965)2014787, +7(495)6124443.

E-mail: sheetikov.s@blood.ru

Авторы:

Шитиков С. А., стажер-исследователь, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Лаборатория трансплантационной иммунологии, Москва, Россия; Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

Кучмий А. А., к. б. н., научный сотрудник, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Лаборатория трансплантационной иммунологии, Москва, Россия;

Быкова Н. А., научный сотрудник, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Ми-

нистерства здравоохранения Российской Федерации, Лаборатория трансплантационной иммунологии, Москва, Россия;

Филькин С. Ю., научный сотрудник, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Лаборатория трансплантационной иммунологии, Москва, Россия;

Романюк Д. С., научный сотрудник, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Лаборатория трансплантационной иммунологии, Москва, Россия;

Ефимов Г. А., к. б. н., заведующий лабораторией, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Лаборатория трансплантационной иммунологии, Москва, Россия; Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для терапии тяжелых случаев опухолевых заболеваний кроветворной системы используют трансплантацию гемопоэтических клеток костного мозга от родственного или неродственного донора после курса химиотерапии и/или радиотерапии — трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Использование такого подхода сопряжено с развитием аллореактивного иммунного ответа, который может обеспечить элиминацию опухолевых клеток либо усугубить общую клиническую картину. Лимфоциты донора, попав в организм больного в составе трансплантата, начинают распознавать антигены пациента как чужеродные, что может приводить к поражению здоровых тканей. Этот процесс называется реакцией «трансплантат против хозяина» (РТПХ), и является самым частым сопутствующим эффектом ТГСК, который часто приводит к летальным исходам [1]. Частный случай РТПХ, когда лимфоциты донора специфически распознают остаточные опухолевые клетки в организме больного, называется реакцией «трансплантат против опухоли» (РТПО) [2]. Главной задачей трансплантационной иммунологии является усиление эффективности противоопухолевого иммунного ответа и одновременное снижение ответа на здоровые ткани. Баланс между РТПХ и РТПО зависит от клонального разнообразия трансплантата, изменение клеточного состава трансплантата может сдвинуть аллогенный иммунный ответ от проявления РТПХ к эффективной РТПО [2].

Было замечено, что при HLA-идентичной трансплантации (донор и реципиент полностью совпадают по всем локусам HLA) развитие РТПХ и РТПО сопряжено с распознаванием так называемых минорных антигенов гистосовместимости (МАГ). МАГ представляют собой пептиды в составе молекул HLA, присутствующие у реципиента, но не у донора, и являются результатом наличия полиморфизмов в геноме. В случаях, когда изменение генетического кода влечет за собой изменения аминокислотной последовательности белка (несинонимичный однонуклеотидный полиморфизм, ОНП) или изменение сайтов узнавания для протеасомной деградации, происходит изменение спектра представленных на поверхности клетки пептидов в контексте молекул HLA. В частности, для минорного антигена HA-2 однонуклеотидный полиморфизм в экзон-кодирующем участке гена MYOG1 приводит к замене метионина на валин в белковом транс-

крипте, что приводит к презентации пептида YIGEVLSV в составе молекулы HLA-A*02 [3].

В тимусе, в ходе созревания, среди предшественников наивных Т-клеток элиминируются те, которые не способны распознавать собственные пептид-HLA комплексы (позитивная селекция) и те, которые связывают собственные пептид-HLA комплексы со слишком высокой аффинностью (негативная селекция). Это позволяет убрать из пула клетки, Т-клеточный рецептор которых способен распознавать собственные молекулы HLA слишком хорошо или не распознает вовсе. Таким образом, если в организме донора отсутствует один из аллелей МАГ (МАГ -/-), то такой МАГ не представляется в тимусе, не происходит делеции наивных Т-клеток, способных реагировать на данный пептид. При пересадке такой пептид становится иммуногенным, то есть может вызывать продуктивный иммунный ответ против МАГ +/- или +/+ тканей.

Экспрессия гена, кодирующего МАГ, преимущественно в гемопоэтической ткани реципиента позволяет направить аллореактивный иммунный ответ на опухоль, минимизировав повреждение здоровых тканей больного [4]. Было показано, что различие между донором и реципиентом по одному минорному антигену вызывает эффективный иммунный ответ при лечении гематологических злокачественных новообразований [4]. На сегодняшний день культуры цитотоксических лимфоцитов, распознающих МАГ уже используются в некоторых клинических исследованиях для терапии онкологических заболеваний кроветворной системы [5, 6].

В настоящий момент множество исследований посвящено изучению репертуаров Т-клеточных рецепторов. Использование методов секвенирования нового поколения позволяет получать последовательности большого количества рецепторов одновременно [7], уникальных для каждого человека. На основании этих данных становится возможным изучение структуры репертуаров Т-клеток для отдельных людей, сравнение таких репертуаров у монозиготных близнецов [8], определение фенотипа популяции [9] и видовой принадлежности [10] по их репертуару.

Данное исследование направлено на анализ репертуаров Т-клеточных рецепторов, распознающих минорный антиген HA-2. При помощи протокола антиген-специфичной экспансии нами были получены и проанализированы Т-клеточные клоны, специфичные к антигену

НА-2. Для этого МАГ было показано влияние на клинический исход ТГСК, его наличие у больных и отсутствие у донора повышали вероятность развития РТПО [4]. После *in silico* анализа последовательностей Т-клеточных рецепторов, распознающих данный антиген мы обнаружили преимущественное использование конкретных V и J генов в формировании α -цепи (V21 и J42) и высокую частоту использования гена V7-8 при формировании β -цепи, что указывает на существование консервативного мотива, ответственного за распознавание данного минорного антигена. В дальнейшем, изучение репертуаров Т-клеточных рецепторов может помочь в понимании механизмов формирования иммунного ответа на различные антигены, а также в идентификации молекулярных механизмов тимусной селекции, ответственных за формирование этих репертуаров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подбор доноров

Образцы цельной крови были получены от здоровых доноров в возрасте >30 лет подписавших информированное согласие, с известным спектром HLA-аллелей, определенных при помощи полимеразной цепной реакции (SSO-ПЦР) на базе ФГБУ ГНЦ Минздрава РФ. Для типирования доноров на наличие однонуклеотидных полиморфизмов, приводящих к появлению минорного антигена НА-2 была проведена ПЦР с использованием аллель-специфичных праймеров (Single (S) Specific (S) Primer (P) — ПЦР) [11]. Реакция проводилась на матрице геномной ДНК с использованием смеси для ПЦР следующего состава: 25 U Taq-полимеразы (EP0402, ThermoScientific, США), 0,01% желатина, 0,2 mM dNTP (R0192, ThermoScientific, США), по 0,5 мкМ праймеров (Евроген, Россия), 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) и 6% сахарозы (S7903, SigmaAldrich, Германия). Геномная ДНК выделялась из цельной крови при помощи набора Wizard® Genomic DNA Purification kit (A1120, Promega, США) по инструкции производителя.

Дифференцировка дендритных клеток из моноцитов периферической крови

Из 30 мл периферической крови методом центрифугирования на градиенте плотности фикола (ПанЭко, Россия) [12] была выделена фракция периферических мононуклеарных кле-

ток крови (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC). Далее, в соответствии с протоколом Chapius с соавторами [13]. Для адгезии моноцитов на культуральный пластик, PBMC культивировались в матрасе T25 (83.1810, Sarstedt, Германия) в течение 4 часов в 4 мл полной среды Gibco™ RPMI 1640 (21875-034, Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 10% человеческой сыворотки, пенициллин/стрептомицин/глутамин (10378016, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, США), и 1 mM пирувата натрия (100X, Thermo Fisher Scientific, США) при 37°C и 5% CO₂. После неадгезированные клетки отмывали культуральной средой. К моноцитам, прилипшим к пластику, добавлялась полная дифференцировочная среда Gibco™ RPMI 1640, содержащая 800 U/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и интерлейкина-4 (IL-4) (130-095-372 и 130-093-917 Miltenyi Biotec, Германия) в концентрации 10 нг/мл соответственно.

Моноциты дифференцировались в дендритные клетки (ДК) в течение 3-х дней, после чего зрелые ДК нагружались синтетическим пептидом НА-2 (YIGEVLVSV) в концентрации 10 нг/мл в активирующей среде, содержащей 800 U/мл ГМ-КСФ, 10 нг/мл IL-4, 10 нг/мл липополисахарида (ЛПС), 100 U/мл интерферон-гамма (IFN γ). После 16-ти часов инкубации ДК снимали с пластика при помощи фосфатного буфера, содержащего 2 mM ЭДТА и клеточного скребка, и облучали 50 мин суммарной дозой в 50 Грей. ДК, которые активировались без добавления пептида, служили негативным контролем.

Получение и экспансия антигенспецифических Т-клеток

Из 50 мл крови выделялись сначала PBMC, затем наивные Т-клетки при помощи набора для изоляции наивных CD8⁺ Т-клеток (130-093-244, The Naive CD8⁺ T Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с протоколом Wölfl с соавторами [14]. Коротко: в соответствии с инструкцией набора по выделению наивных Т-клеток (CCR7⁺CD45RO⁻CD8⁺), на первой стадии производилась деплеция не-наивных Т-клеток и НК-клеток при помощи смеси антител (анти-CD45RO, анти-CD56, анти-CD57, анти-CD244), сшитых с биотином, и вторичных антител к биотину, конъюгированных с магнитными частицами. Деплеция проводилась на LD колонке (130-042-901, Miltenyi Biotec, Герма-

ния). На второй стадии происходила непосредственно позитивная селекция наивных CD8⁺ Т-клеток на MS колонке магнитной сепарации (130-042-201, Miltenyi Biotec, Германия) с использованием анти-CD8 антител, конъюгированных с магнитными частицами.

Выделенные наивные Т-клетки смешивали с аутологичными облученными активированными дендритными клетками, в соотношении 2:1 (Т-клетки: дендритные клетки). Клетки рассаживали на 48-луночные культуральные планшеты (677 180, Sigma-Aldrich, Германия), в количестве от $2 \cdot 10^5$ до $1 \cdot 10^6$ CD8⁺ наивных Т-клеток на лунку. Культивация проводилась в стандартной среде с добавлением IL-21 (130-095-767, Miltenyi Biotec, Германия) в концентрации 30 нг/мл в первый день. На 3, 5 и 7 день добавлялись цитокины IL-7 и IL-15 (190-093-937 и 130-095-760, Miltenyi Biotec, Германия) в концентрации 5 нг/мл каждого.

Проточная цитофлуориметрия

Для определения антигенной специфичности Т-клеточных культур на 10–12 день культивации из каждой лунки отбиралось по $1 \cdot 10^6$ клеток для окрашивания HLA-тетрамерами, конъюгированными с флуорохромами и нагруженными HA-2 пептидом. HLA-тетрамеры были получены в нашей лаборатории по протоколу из лаборатории Toebe M. [15]

На предварительной стадии происходила сборка HLA-тетрамеров из мономеров на льду. Для окрашивания $1 \cdot 10^6$ клеток использовали ~200 нг HLA-мономеров, конъюгированных с биотином, которые смешивались с 200 нг стрептавидин-фикоэритрина, осуществляющего сборку (S866, Thermo Fisher Scientific, США) в 10 мкл фотфатного буфера с добавлением 0,5% бычьего сывороточного альбумина (126579, Merck, Германия) и 2 мМ ЭДТА (PBS/BSA/EDTA), в течение 45 минут в темноте.

Параллельно с этим, клеточные суспензии центрифугировались (400 g, 7 минут, 4°C), после чего клеточный осадок суспендировали в 10 мкл PBS/BSA/EDTA, и добавляли по 10 мкл буфера, содержащего собранный тетрамер. Далее происходила инкубация в течение 45 минут на льду в темноте, после чего пробы однократно отмывались, путем разведения в 0,5 мл буфера и центрифугирования. Затем, культуры окрашивались антителами для проточной цитофлуориметрии. Окрашивание производилось в 50 мкл буфера в течение 15 минут на льду. В данной работе исполь-

зовались мышиные антитела к человеческим антигенам: анти-CD3 Alexa Fluor® 700 (BD557943), анти-CD8 PerCP-Cy™5.5 (BD565310), анти-CCR7 APC-R700 (BD560619), анти-CD45RO PE-Cy™7 (BD337168) (BD Biosciences, США), анти-CD137 PE (12-1379-42, eBioscience™, США). Также был использован интеркалирующий краситель пропидий-йодид (1186276, PI, Thermo Fisher Scientific, США) для разделения живых и мертвых клеток. Анализ производился на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II. При анализе учитывались только живые одиночные клетки.

Получение лимфобластоидных клеточных линий в качестве антигенпрезентирующих клеток

Для создания аутологичной лимфобластоидной клеточной линии лимфоциты донора выделялись из крови в градиенте плотности фиколла, после чего фракция периферических мононуклеарных клеток осаждалась в центрифуге (350 g, 10 минут, 4°C) и разводилась в 3 мл раствора, содержащего $\sim 3 \cdot 10^6$ частиц вируса Эпштейн-Барр. После 24 часов инкубации при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе, к суспензии добавлялась среда RPMI 1640, содержащая 20% фетальной бычьей сыворотки (SH30071.03HI, FBS HyClone™, GE Healthcare, США) и 200 нг/мл циклоспорина А. Спустя 2 недели клетки переводились в среду, содержащую 10% FBS.

Рестимуляция Т-клеточной культуры

Для активации антиген специфичных Т-клеток минорным антигеном, пептид HA-2 должен быть представлен в контексте молекул HLA. Для этого В-клетки лимфобластоидной клеточной линии (B-LCL) донора нагружались пептидом в течение 1 часа с в финальной концентрации 10 мМ с последующим облучением в дозе 50 Грей в течение 1 часа.

Непосредственно для стимуляции использовалось $5 \cdot 10^5$ LCL-клеток на каждую лунку культурального планшета, которые добавлялись в лунки с Т-клеточной линией в культуральной среде с добавлением IL-2 в финальной концентрации 50 ед./мл, IL-7 и IL-15 в концентрации 5 нг/мл каждого. Спустя 24 часа после стимуляции, активированные CD8⁺ Т-клетки экспрессировали на поверхности костимуляторную молекулу CD137 (4-1BB) [16].

Получение антиген-специфических клеток, экспрессирующих поверхностный активационный маркер CD137 (4-1BB)

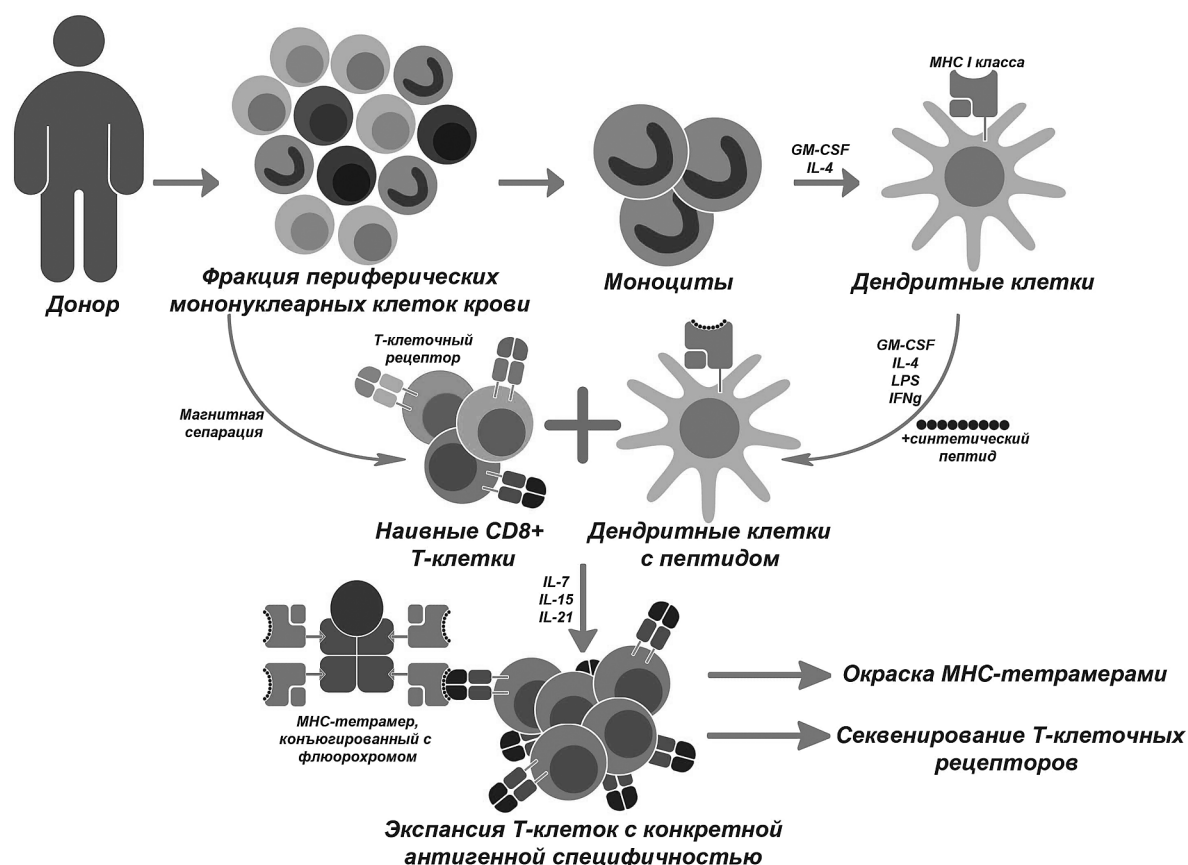


Рис. 1. Общая схема эксперимента. На первом этапе из крови доноров выделялась фракция периферических мононуклеарных клеток. Далее, из этой фракции выделялись моноциты, которые дифференцировались в дендритные клетки, активировались и нагружались синтетическим пептидом. При помощи магнитной сепарации из мононуклеаров выделялись наивные CD8⁺ Т-клетки, которые затем ко-культивировались с активированными дендритными клетками, окрашивались HLA-тетрамерами и выделялись при помощи молекулы CD137 для дальнейшего секвенирования Т-клеточных рецепторов.

Далее, для анализа свойств Т-клеточной культуры, с определенной антигенной специфичностью, активированные Т-клетки выделялись из клеточной суспензии методом магнитной сепарации. Поскольку активация происходила антиген-специфично, то и маркер активации CD137 экспрессировался, в основном, на антиген-специфичных Т-клетках.

Культура Т-клеток окрашивалась анти-CD137 антителом, конъюгированным с фикоэритрином (PE). После отмывки (400 g, 7 минут, 4°C) в смесь добавлялось вторичное антитело, анти-PE, конъюгированное с магнитной частицей (130-048-801, Miltenyi Biotec, Германия). Магнитная сепарация проводилась в соответствии с протоколом производителя на MS-магнитной колонке с использованием OctoMACS-сепаратора (магнит для сепарации) (130-042-109, Miltenyi Biotec, Германия). Итоговая обогащенная фракция CD137⁺ содержала в себе, преимущественно, CD137^{hi} клетки.

Секвенирование α и β цепей Т-клеточного рецептора

Полученная после магнитной сепарации фракция CD137^{hi} клеток $0.2-1 \cdot 10^6$ центрифугировалась (400 g, 7 мин, 4°C) и лизировалась в 0,5 мл TRIzol® LS Reagent (10296028, Thermo Fisher Scientific, США). Далее, по протоколу от производителя, осуществлялась экстракция РНК из лизата. Для получения первой цепи кДНК, кодирующей последовательности α и β цепей Т-клеточного рецептора, использовалась РНК-зависимая-ДНК-полимераза MINT-ревертаза (Евроген, Россия) на матрице полученной РНК в количестве 1 мкг по опубликованному протоколу, с использованием праймеров из работы Mamedov et al [7]. Затем следовало 2 последовательных ПЦР с использованием Encyclo полимеразы и праймеров из набора Mint RACE primer set [7]. Далее, каждая из цепей была за-

клонирована в pAL2-Т вектор. Фрагменты рецепторов были вырезаны из 1% агарозного геля и выделены из него с использованием коммерческого набора GeneJet Gel Extraction Kit (K0691, Thermo Scientific, США). Реакция с pAL2-Т вектором проходила с 3-х кратным молярным избытком фрагмента рецептора, лигирование при помощи T4 лигазы проводилось в 20 мкл реакционной смеси в течение 30 минут при комнатной температуре.

Затем, половина смеси после лигирования использовалась для трансформации в компетентные клетки *E.coli* (штамм DH5 α). К компетентным клеткам DH5 α *E.coli* добавлялось 10 мкл лигазной смеси и 4 мкл β -меркаптоэтанола. После 10 минут инкубации на льду у клеток индуцировался термический шок, путем помещения в температуру 42°C на 90 секунд. Далее, после 2-х минутного охлаждения, происходила инкубация при 37°C в течение 30 минут. Бактериальная культура была рассеяна в чашках Петри на LB агар, содержащий карбенициллин в концентрации 50 мкг/мл, и инкубировались 16 часов при температуре 37°C. На следующий день одиночные колонии снимались с чашки Петри, осуществлялась реакция колони-ПЦР и производилась амплификация плазмид, несущих вставку. Полученные плазмиды отправлялись на секвенирование в фирму «Евроген».

Данные по сиквенсам обрабатывались при помощи программного обеспечения ImMuno GeneTics (<http://www.imgt.org/>) и программы CLC Genomics Workbench 7.

In silico анализ последовательностей CDR3 участков был проведен при помощи программы Gephi.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отбор доноров и получение ТКР, распознающих минорный антиген HA-2

Доноры для данного исследования были отобраны по критерию требуемого генотипа по HLA и МАГ. Поскольку минорный антиген HA-2 презентруется в составе молекулы HLA-A*02, то отбирались только доноры, несущие в своем организме данную аллель. Так же необходимо было отобрать доноров, в геноме которых нет однонуклеотидного полиморфизма, приводящего к появлению минорного антигена HA-2. У таких доноров пептид HA-2 не представляется в тимусе, что приводит к тому, что наивные Т-клетки, специфичные к этому пептиду не элиминируются из репертуара в процессе отрицательной селекций.

Общая схема эксперимента представлена на **рисунке 1**. После 14 дней культивации с добавлением цитокинов IL-21, IL-7, IL-15, наличие HA-2 специфичных клеток детектировано при помощи HLA-тетрамеров, пример такого окрашивания представлен на **рисунке 2**.

На следующей стадии мы использовали рестимуляцию и выделение CD137⁺ клеток при помощи магнитной сепарации с использованием анти-CD137 антитела, поскольку HLA-тетрамеры обладают сравнительно низкой авидностью, и не позволяют выделить Т-клеточные популяции с низкой экспрессией ТКР, или потенциальные Т-клеточные популяции с низкой аффинностью к антигену [17]. Пример окраски на CD137 до и после сепарации приведен на **рисунке 3**. Для упрощения процедуры выделения CD137^{hi} популяции клетки из всех лунок были

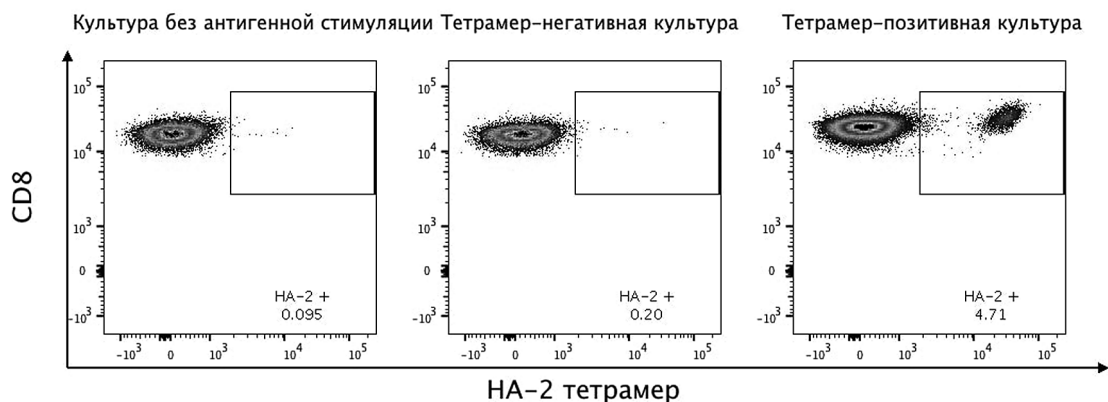


Рис. 2. Пример окрашивания HA-2 тетрамером культур, получивших антигенную стимуляцию. В качестве негативного контроля была сделана культура, не получившая синтетический пептид HA-2 антигена на стадии активации дендритных клеток.

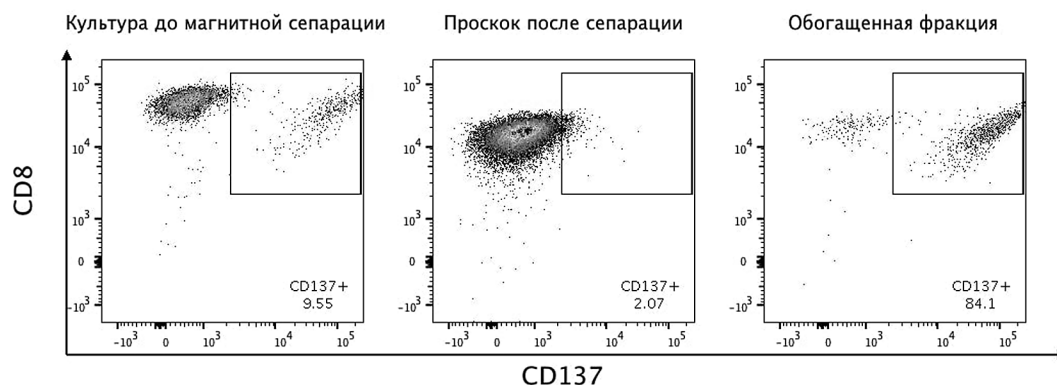


Рис. 3. Окрашивание на маркер CD137 до и после магнитной сепарации.

объединены. В связи с этим, дальнейшие попытки спарить α и β цепи ТКР не представляются возможным, поскольку культура приобрела статус поликлональной.

Для определения клонального состава субпопуляции, обладающей способностью распознавать минорный антиген, нами были отсекарованы нуклеотидные последовательности, кодирующие α и β цепи Т-клеточных рецепторов [16]. По схеме, изображенной на рисунке 4 производилась пробоподготовка и секвенирование Т-клеточных рецепторов данных культур.

Известно, что, не смотря на сниженную экспрессию непродуктивно-перестроенных ТКР, в клетке может обнаруживаться их мРНК. При

помощи CLC Genomics Workbench 7 и программного обеспечения ImMunoGeneTics (<http://www.imgt.org/>) мы проанализировали данные, полученные после секвенирования одиночных бактериальных клонов, проанализировали рамку считывания и наличие стоп-кодона в полученных сиквенсах и отобрали для дальнейшего изучения только продуктивные клоны. Обработанные результаты сиквенсов Т-клеточных культур представлены в таблице 1.

Анализ репертуара ТКР, специфически распознающих HA-2 МАГ

Далее был проведен анализ последовательностей HA-2-специфичных рецепторов для того

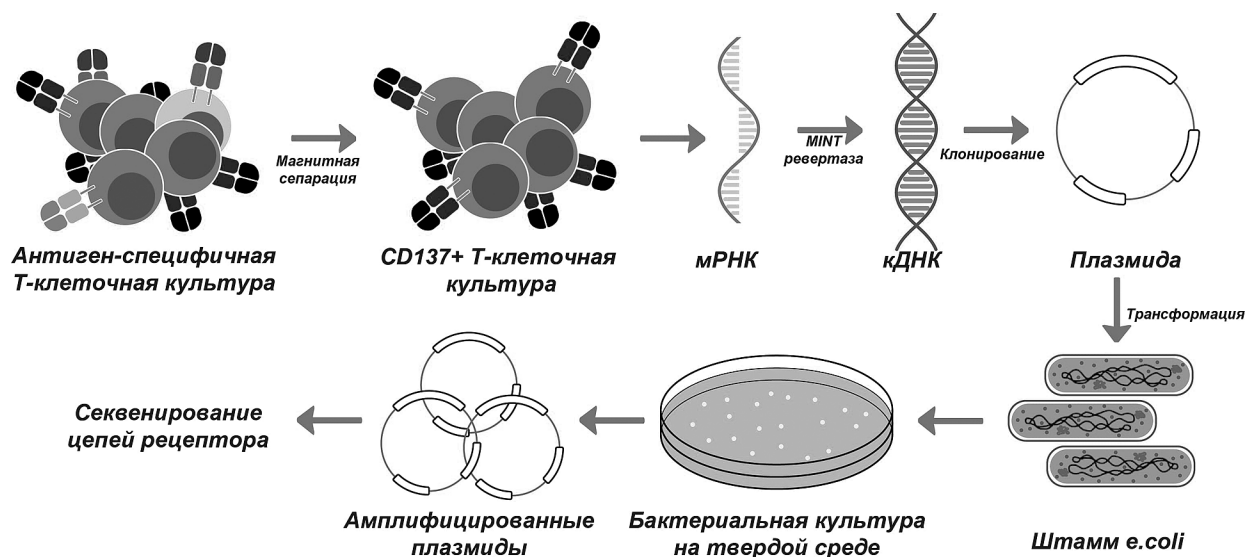


Рис. 4. Схема выделения и секвенирования кодирующей последовательности кДНК из антиген-специфичной Т-клеточной культуры. После рестимуляции Т-клеточной культуры В-LCL клеточной линией нагруженной пептидом HA-2, специфичные клетки экспрессировали на своей поверхности костимуляторную молекулу CD137. При помощи магнитной сепарации CD137^{hi} клетки отделялись, после чего из них выделялась мРНК и с использованием ревертазы MINT синтезировалась кДНК. Далее кДНК клонировалась в pAL2-T вектор и трансформировалась в *E. coli*, после чего происходил отбор колоний, амплификация и секвенирование полученных рецепторов.

чтобы выявить имеются ли среди них публичные клоны (одинаковые клоны, обнаруженные у разных людей), консервативные аминокислотные мотивы и преимущественное в использовании определенных V и J генов. Наличие таких закономерностей может указывать на то, что у разных людей ответ на этот МАГ осуществляется при помощи схожих Т-клеточных клонов, которые независимо друг от друга претерпевают одинаковые этапы селекции в тимусе. Ранее, в работе [18] уже были описаны некоторые последовательности Т-клеточных рецепторов, распознающих минорный антиген НА-2, эти опубликованные клоны также были взяты в анализ. Итого, было проанализировано 38 клонов полученных в рамках этой работы лаборатории и 14 ранее описанных клонов [18]. Для α -цепи было обнаружено два публичных клон, а также несколько клонов отличающихся друг от друга на 1 или 2 аминокислотные замены (рис. 5). Наличие таких клонов указывает на присутствие мотива, отвечающего за связывание ТКР с НА-2 пептидом. Мы представили последовательности α -цепи в виде графа последовательностей CDR3 участков (участков, ответственных за узнавание

антигена в контексте HLA-молекулы), в котором последовательности отличающиеся на одну или две замены (или делеции) связаны ребрами (рис. 5). Связная компонента графа (совокупность связанных между собой вершин графа) содержала в себе 12 последовательностей, включая оба публичных клон.

Мы предположили, что данная связная компонента содержит в себе мажорный мотив для связывания НА-2, для этого мы провели аминокислотное выравнивание CDR3 участков α -цепей НА-2-специфичных рецепторов в связной компоненте (рис. 6).

Выравнивание связной компоненты показало, что большую часть вклада в формирование мотива внес ген TCRAJ42 (100% использование), но сопряженная консервативная позиция 6 (G/N) — результат случайных вставок. Анализ использования V генов показал, что в α -цепи наиболее часто встречался ген TCRAV21, который занял 33% всех последовательностей CDR3 и 75% от последовательностей связной компоненты (Рисунок 7А, фиолетовый цвет). Остальные сегменты (TCRAV5, TCRAV16, TCRAV35, TCRAV20 и др.), каждый из которых встреча-

Таблица 1. Результат определения V и J генов неспаренных цепей отсеквенированных НА-2-специфичных Т-клеточных рецепторов.

α -цепь			β -цепь		
V ген	J ген	Длина CDR3	V ген	J ген	Длина CDR3
TRAV5	TRAJ11	10	TRBV28	TRBJ2-2	14
TRAV5	TRAJ42	16	TRBV2	TRBJ2-7	14
TRAV27	TRAJ41	12	TRBV7-8	TRBJ2-1	13
TRAV16	TRAJ29	10	TRBV7-8	TRBJ1-1	13
TRAV19	TRAJ45	15	TRBV7-8	TRBJ2-7	10
TRAV9-2	TRAJ42	14	TRBV18	TRBJ1-5	18
TRAV39	TRAJ43	7	TRBV18	TRBJ1-5	18
TRAV21	TRAJ42	14	TRBV7-8	TRBJ2-5	13
TRAV20	TRAJ42	14	TRBV6-5	TRBJ2-5	15
TRAV20	TRAJ42	14	TRBV28	TRBJ2-2	14
TRAV3	TRAJ5	13	TRBV28	TRBJ2-2	14
TRAV21	TRAJ42	15	TRBV28	TRBJ2-7	12
TRAV21	TRAJ42	15	TRBV15	TRBJ1-6	13
TRAV21	TRAJ42	14	TRBV7-9	TRBJ2-1	13
TRAV16	TRAJ29	10			
TRAV10	TRAJ26	12			

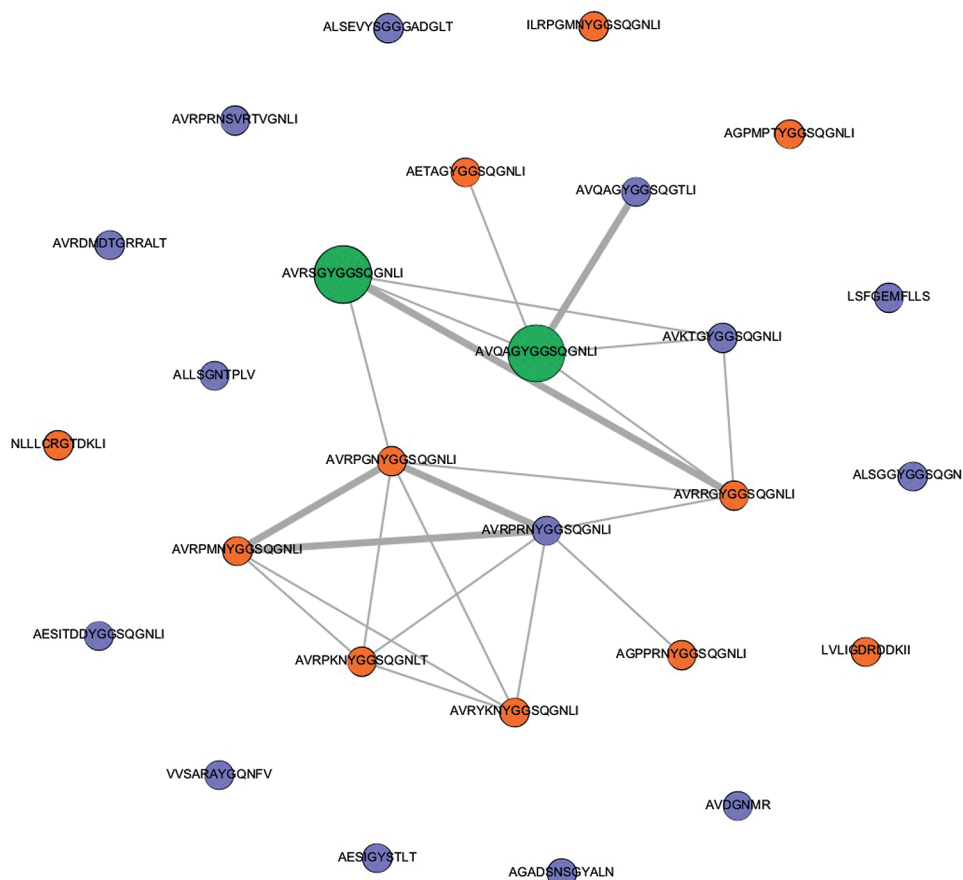


Рис. 5. Кластеризация полученных последовательностей рецепторов с ранее известными. Оранжевым обозначены CDR3 участки α -цепей, описанные группой Heemskerk, фиолетовым обозначены CDR3 участки, полученные нами, зеленым — обнаруженные в обоих исследованиях. Толстые и тонкие линии обозначают одну и две аминокислотные замены соответственно.



Рис. 6. Графическое отображение частот аминокислот, представленных в CDR3 участке α -цепи HA-2-специфичных Т-клеточных рецепторов. По горизонтальной оси отложены порядковые номера аминокислот в выровненных CDR3 участках α -цепей HA-2-специфичных рецепторов, по вертикальной оси отложена частота встречаемости аминокислоты среди этих CDR3 участков. Высота и количество букв в каждом положении отражает частоту и количество аминокислот в конкретном положении среди CDR3 участков. С 1 по 6 аминокислоту указан вклад С-конца V гена, с 7 по 15 — вклад N-конца J-гена.

ется примерно в 10% Т-клеточных рецепторов, вносят менее существенный вклад. Среди всех J генов α -цепи доминирует ген TCRAJ42, который встречается более чем в 60% всех HA-2 специфичных рецепторов и во всех последова-

тельностьх связной компоненты (**рис. 7В**, фиолетовый цвет), что может указывать на то, что существенный вклад в формирование HA-2-специфичного мотива CDR3 участка α -цепи вносит именно ген TCRAJ42.

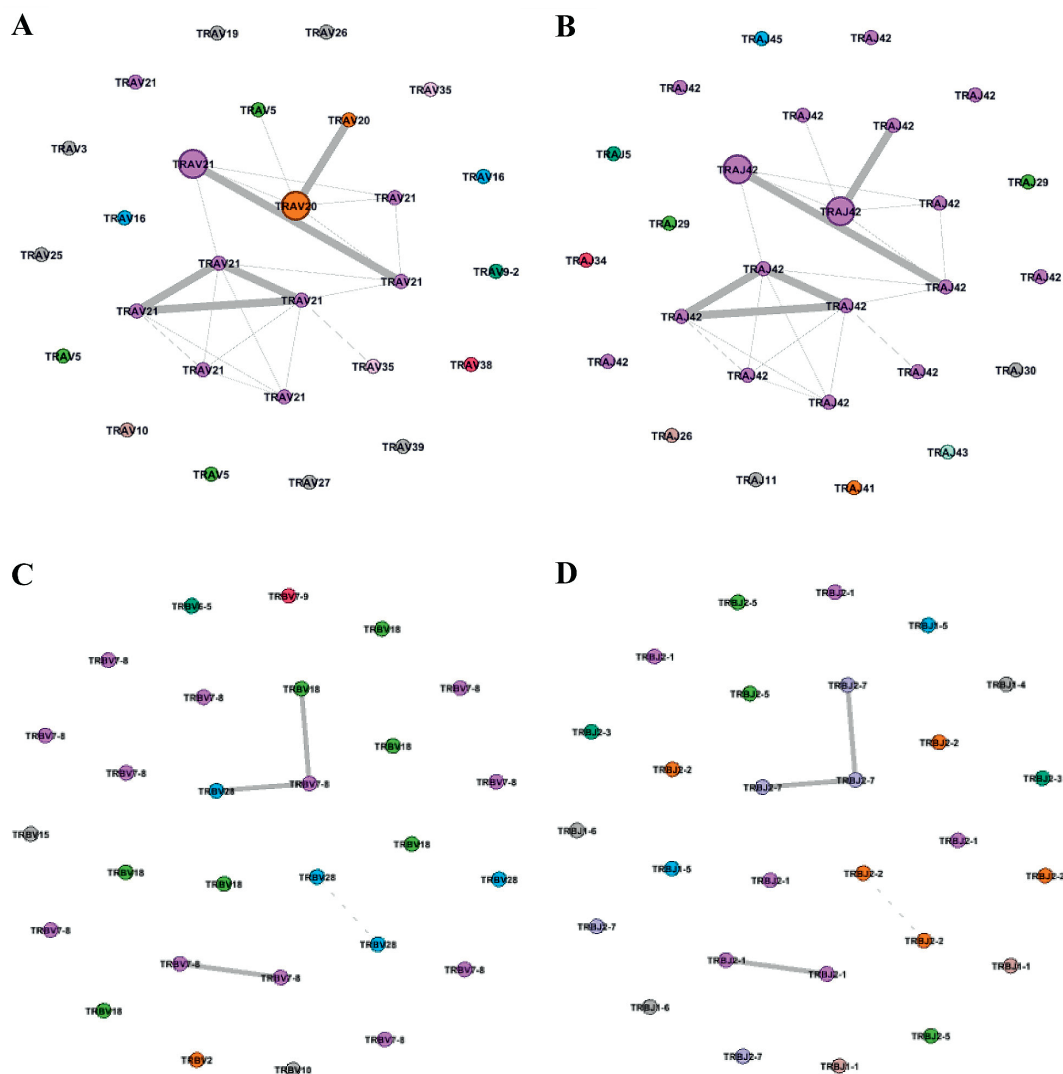


Рис. 7 (A-D). Кластеризация последовательностей CDR3 α и β -цепей HA-2-специфичных Т-клеточных рецепторов по V и J генам рецептора. А – кластеризация по CDR3 участку α -цепи, окрашивание по V гену, В – кластеризация по CDR3 участку α -цепи, окрашивание по J гену, С – кластеризация по CDR3 участку β -цепи, окрашивание по V гену, D – кластеризация по CDR3 участку β -цепи, окрашивание по J гену. На рисунках А и В тонкая линия отражает расстояние между CDR3 участками в одну аминокислотную замену, толстая в две аминокислотных замены. На рисунках С и D толстая линия отражает расстояние в две аминокислотных замены, тонкая в три.

Для β -цепи публичных CDR3 участков обнаружено не было. V ген HA-2 специфических рецепторов для β -цепи не образует ярко выраженного кластера по CDR3 участку, однако было замечено преобладание часто встречающегося гена TCRVB7-8 более чем в 40% CDR3 участках (**рисунок 7 С и D**, фиолетовый цвет). Из этого можно сделать вывод, что узнавание минорного антигена HA-2 происходит в основном при помощи CDR3 α -цепи Т-клеточного рецептора, в то время как в CDR3 участки β -цепи не гомологичны. Преобладание сегмента TCRVB7-8 может указывать на вклад в распознавание этого антигена CDR1 и CDR2 участков β -цепи.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время проблема изучения алло-реактивного иммунного ответа после трансплантации стволовых клеток крови от родственного или неродственного донора является актуальной, поскольку молекулярные механизмы её развития до конца не изучены. Усиление РТПО представляет собой потенциальное дополнение к основной противоопухолевой терапии для предотвращения возникновения рецидива, в то время как РТПХ представляет серьезную опасность для пациентов. При HLA-совместимой трансплантации мишенью для обеих реакций

являются минорные антигены гистосовместимости, профиль экспрессии которых может влиять на развитие иммунного ответа в ту или другую сторону. Изучение иммунного ответа на конкретные минорные антигены может помочь в разработке подходов к снижению частоты развития РТПХ и усилении эффекта РТПО.

В данном исследовании были изучены репертуары Т-клеточных рецепторов, специфичных к минорному антигену гистосовместимости HA-2, презентируемого в контексте аллеля HLA-A*02, для которого была показана экспрессия преимущественно в гемопоэтических клетках. Так же было показано, что HA-2-специфичные Т-клеточные клоны проявляют высокую противоопухолевую активность [4]. Все это потенциально делает HA-2 антиген хорошей мишенью для изучения в контексте РТПО.

Сравнивая данные, полученные нами с данными группы Heemskerk мы обнаружили, что для HA-2-специфичных рецепторов характерно наличие выраженного мотива в CDR3 участке на α -цепи, и отсутствие такового для β -цепи. Образование данного мотива на α -цепи объясняется высокой частотой использования конкретных V и J генов при сборке данной цепи (чаще всего TCRAV21 и TCRAJ42). При выравнивании аминокислотных последовательностей CDR3 участков α -цепи, входящих в состав связной компоненты графа (рис. 6) видно, что С-конец J гена вносит наибольший вклад в формирование доминантного мотива, ответственного за распознавание Т-клеточным рецептором комплекса HLA молекулы с HA-2 пептидом. Для β -цепи похожих закономерностей в формировании CDR3 участка обнаружено не было, однако видно, что в β -цепи превалирует V сегмент TCRVB7-8. Это может указывать на то, что CDR3 участок β -цепи не несет значимой роли в распознавании пептида HA-2, но при этом вероятно важны участки CDR1 и CDR2, обеспечивающие консервативное распознавание молекулы HLA. Какой-либо зависимости в выборе J гена для β -цепи обнаружено не было.

Выводы, сделанные нами на основе *in silico* анализа HA-2-специфичных рецепторов, нуждаются в дополнительном подтверждении. Полученных данных на этом этапе недостаточно, чтобы с абсолютной уверенностью рассуждать о консервативности HA-2-специфичных мотивов α -цепи. Необходимо расширение панели доноров с аллелью HLA-A*02 и генотипом HA-2—/— для получения HA-2-специфичных

культур и секвенирования их рецепторов. В дальнейшем, использование кластерного анализа для культур с известной антигенной специфичностью может помочь в предсказании специфичности произвольного Т-клеточного рецептора по его последовательности [19–21].

Изучение минорных антигенов гистосовместимости может стать основой для персонализированной терапии в отношении опухолевых заболеваний кроветворной системы. На сегодняшний день нет возможности подбирать донора исходя из спектра представленных минорных антигенов в организме донора и реципиента. Однако, в дальнейшем, генная инженерия Т-клеточных рецепторов может сделать возможным создание персонализированных библиотек рецепторов, которые будут распознавать антигены исключительно на гемопоэтических клетках, минимизируя шанс возникновения РТПХ и запуская реакцию против опухолевых клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Barrett A. J., Battiwalla M. Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol* 2010, 3, 429–441.
2. Birnbaum M. E., Mendoza J. L., Sethi D. K., Dong S., Glanville J., Dobbins J., Özkan E., Davis M. M., Wucherpfennig K. W., Garcia K. C. Deconstructing the peptide-MHC specificity of T cell recognition. *Cell* 2014, 157, 1073–1087.
3. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968, Suppl 97, 77–89.
4. Chapuis F., Rosenzweig M., Yagello M., Ekman M., Biberfeld P., Gluckman J. C. Differentiation of human dendritic cells from monocytes *in vitro*. *European Journal of Immunology* 1997, 27, 431–441.
5. Dash P., Fiore-Gartland A. J., Hertz T., Wang G. C., Sharma S., Souquette A., Crawford J. C., Clemens E. B., Nguyen T. H. O., Kedzierska K. Quantifiable predictive features define epitope-specific T cell receptor repertoires. *Nature* 2017, 547, 89.
6. den Haan J. M., Sherman N. E., Blokland E., Huczko E., Koning F., Drijfhout J. W., Skipper J., Shabanowitz J., Hunt D. F., Engelhard V. H., and et al. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science* 1995, 268, 1476–1480.
7. Glanville J., Huang H., Nau A., Hatton O., Wagar L. E., Rubelt F., Ji X., Han A., Krams S. M., Pettus C., et al. Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire. *Nature* 2017, 547, 94–98.
8. Heemskerk M. H., Hoogeboom M., de Paus R. A., Kester M. G., van der Hoorn M. A., Goulmy E., Willemze R., Falkenburg J. H. Redirection of antileukemic reactivity of peripheral T lymphocytes using gene transfer of mi-

- nor histocompatibility antigen HA-2-specific T-cell receptor complexes expressing a conserved alpha joining region. *Blood* 2003, 102, 3530–3540.
9. Heemskerk M. H., Hooigeboom M., Hagedoorn R., Kester M. G., Willemze R., Falkenburg J. H. Reprogramming of virus-specific T cells into leukemia-reactive T cells using T cell receptor gene transfer. *J Exp Med* 2004, 199, 885–894.
 10. Hobo W., Broen K., van der Velden W. J., Greupink-Draaisma A., Adisty N., Wouters Y., Kester M., Fredrix H., Jansen J. H., van der Reijden B., et al. Association of disparities in known minor histocompatibility antigens with relapse-free survival and graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013, 19, 274–282.
 11. Li H. M., Hiroi T., Zhang Y., Shi A., Chen G., De S., Metter E. J., Wood W. H., Sharov A., Milner J. D., et al. TCR β repertoire of CD4(+) and CD8(+) T cells is distinct in richness, distribution, and CDR3 amino acid composition. *Journal of Leukocyte Biology* 2016, 99, 505–513.
 12. Madi A., Poran A. T cell receptor repertoires of mice and humans are clustered in similarity networks around conserved public CDR3 sequences. 2017, 6.
 13. Mamedov I. Z., Britanova O. V., Zvyagin I. V., Turchaninova M. A., Bolotin D. A., Putintseva E. V., Lebedev Y. B., Chudakov D. M. Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Front Immunol* 2013, 4, 456.
 14. Meij P., Jedema I., van der Hoorn M. A., Bongaerts R., Cox L., Wafelman A. R., Marijt E. W., Willemze R., Falkenburg J. H. Generation and administration of HA-1-specific T-cell lines for the treatment of patients with relapsed leukemia after allogeneic stem cell transplantation: a pilot study. *Haematologica* 2012, 97, 1205–1208.
 15. Toebe M., Rodenko B., Ova H., Schumacher T. N. Generation of peptide MHC class I monomers and multimers through ligand exchange. *Curr Protoc Immunol* 2009, Chapter 18, Unit 18 16.
 16. van Bergen C. A., van Luxemburg-Heijs S. A., de Wree L. C., Eefting M., von dem Borne P. A., van Balen P., Heemskerk M. H., Mulder A., Claas F. H., Navarrete M. A., et al. Selective graft-versus-leukemia depends on magnitude and diversity of the alloreactive T cell response. *J Clin Invest* 2017, 127, 517–529.
 17. Vdovin A. S., Postovskaya A. M., Bykova N. A., Romaniuk D. S., Alieva A. K., Yefimova P. R., Sheetikov S. A., Julhakyan H. L., Efimov G. A. Comparative analysis of minor histocompatibility antigens genotyping methods. *Oncohematology* 2016, 11, 40–50.
 18. Warren E. H., Fujii N., Akatsuka Y., Chaney C. N., Mito J. K., Loeb K. R., Gooley T. A., Brown M. L., Koo K. K., Rosinski K. V., et al. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood* 2010, 115, 3869–3878.
 19. Wolfl M., Greenberg P. D. Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8+ T cells. *Nat Protoc* 2014, 9, 950–966.
 20. Wolfl M., Kuball J., Ho W. Y., Nguyen H., Manley T. J., Bleakley M., Greenberg P. D. Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8(+) T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood* 2007, 110, 201–210.
 21. Zvyagin I. V., Pogorelyy M. V., Ivanova M. E., Komech E. A., Shugay M., Bolotin D. A., Shelenkov A. A., Kurnosov A. A., Staroverov D. B., Chudakov D. M., et al. Distinctive properties of identical twins' TCR repertoires revealed by high-throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014, 111, 5980–5985.

IN SILICO ANALYSIS OF T-CELL RECEPTORS SPECIFIC TO THE MINOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN HA-2

© 2019 S.A. Sheetikov^{1,2*}, A.A. Kuchmiy¹, N.A. Bykova¹,
S. Yu. Filkin¹, D.S. Romaniuk¹, G.A. Efimov^{1,2}

*E-mail: sheetikov.s@blood.ru

¹National Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences (HSC),
laboratory of transplantation immunology, Moscow, Russia;

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Received: 25.12.2018. **Accepted:** 21.01.2019

Hematopoietic stem cells transplantation of (HSCT) from the related or unrelated donor is used as a treatment for hematopoietic system malignancies. However, transplantation triggers an immune response of the donor cells to the recipient's antigens. The response to the healthy tissues is called a graft versus host reaction (GVHD), and the response to the hematopoietic tissue in the context of malignant disease is called a graft versus leukemia (GVL) effect. The development of GVL reactivity is a favorable consequence of transplantation, since it eliminates residual tumor cells and prevents the relapse. It was demonstrated that immune response arises towards polymorphic peptides, presented in the molecules of the major histocompatibility complex (HLA). Such peptides are derived from the proteasomal degradation of proteins expressed from the genes with non-synonymous single nucleotide polymorphisms and are referred to as minor histocompatibility antigens (MiHA). Studying the structure of T-cell receptor (TCR) repertoires that recognize MiHAs can help identify the mechanisms for the formation of the alloreactive response and is important for predicting the antigen of alloreactive clones with unknown specificity. In this article the genetic sequences encoding T-cell receptors specific to the HA-2 minor antigen were determined and analyzed *in silico*. We found the predominant use of the V21 and J42 segments in the formation of the CDR3 region of the α -chain and the presence of the V7-8 segment in most CDR3 β -chain regions, which indicates the existence of a conservative motif responsible for recognizing the HA-2 antigen.

Key words: GVHD, GVL, HSCT, T cell receptor, minor antigens of histocompatibility, alloreactive response

Authors:

Sheetikov S.A., ☒ trainee-researcher, National Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences (HSC), laboratory of transplantation immunology, Moscow, Russia; Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.

125167, Moscow, Novy Zykovsky pr. 4, National Research Center for Hematology. Phone: +7(965)2014787 (mob.), +7(495)6124443.
E-mail: sheetikov.s@blood.ru;

Kuchmiy A.A., PhD (Biology), research scientist National Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences (HSC), laboratory of transplantation immunology, Moscow, Russia;

Bykova N., research scientist National Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences (HSC), laboratory of transplantation immunology, Moscow, Russia;

Filkin S., research scientist National Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences (HSC), laboratory of transplantation immunology, Moscow, Russia;

Romanyuk D., research scientist National Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences (HSC), laboratory of transplantation immunology, Moscow, Russia;

Efimov G., PhD (Biology), Head of Laboratory National Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences (HSC), laboratory of transplantation immunology, Moscow, Russia; Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.