

## РОЛЬ TCR-АКТИВАЦИИ КЛЕТОК В ФОРМИРОВАНИИ МАЛЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ T-ХЕЛПЕРОВ

© 2018 г. В. П. Тимганова, С. А. Заморина, М. С. Бочкова,  
П. В. Храмцов, М. Б. Раев

ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, филиал «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук», Пермь, Россия

Поступила: 11.05.2018. Принята: 20.06.2018

Изучали роль самостоятельного эффекта TCR-активации в формировании малых субпопуляций T-лимфоцитов-хелперов – Treg, TCM, TEM, TEMRA. Показано, что в условиях TCR-активации происходило перераспределение пулов клеток в пользу эффекторных субпопуляций (TEM, TEMRA), одновременно снижалось количество наивных T-клеток и TCM. В отношении Treg продемонстрировано, что TCR-активация клеток приводила к повышению внутриклеточной экспрессии FOXP3, HELIOS, CTLA-4. В целом, присутствие TCR-активатора приводит к повышению количества эффекторных T-хелперов, которое сопровождается одновременным повышением уровня супрессорных Treg.

**Ключевые слова:** TCR, T-хелперы, Treg, T-клетки иммунной памяти, наивные T-клетки, T-клетки центральной памяти

DOI: 10.31857/S102872210002426-3

**Адрес:** 614081, Пермский край, г. Пермь, ул. Голева, д.13, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук», Тимганова Валерия Павловна. Тел.: +79028361455, 8(342)2807794.  
**E-mail:** timganovavp@gmail.com

### Авторы:

**Тимганова В. П.**, к.б.н., м.н.с. лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь Россия;

**Заморина С. А.**, д.б.н., в.н.с. лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

**Бочкова М. С.**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

**Храмцов П. В.**, к.б.н., м.н.с. лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

**Раев М. Б.**, д.б.н., в.н.с. лаборатории экологической иммунологии «ИЭГМ УрО РАН», Пермь Россия;

### ВВЕДЕНИЕ

Активация клеток подразумевает переход из состояния покоя в функционально активное состояние — для лимфоцита это переход из фазы G0 в S-фазу клеточного цикла, что в конечном итоге, приводит к пролиферации, поскольку исходная численность клеток в каждом клоне мала. Активация лимфоцитов связана с экспрессией генов, обеспечивающих пролиферативную экспансию клона и прежде всего, это касается

экспрессии индуцибельных генов интерлейкина-2 (IL-2) и  $\alpha$ -цепи его рецептора (CD25) [1]. В физиологических условиях (*in vivo*) индуктором активации служит антигенный стимул, формирующийся после взаимодействия T-хелпера с антиген-презентирующей клеткой (АПК). Интерфейс между T-лимфоцитом и АПК состоит из следующих молекул: TCR/CD3/CD45, CD8 или CD4, CD28, CD2, CD40L; и комплементарные молекулы-лиганды со стороны АПК: пептид, МНС-I или II, B-7 (CD80/86), LFA-3 (CD58), CD40. При взаимодействии антигенного комплекса с T-клеточным рецептором (TCR) в сочетании с костимулирующим воздействием (CD28) возникает двойственный сигнал, достигающий ядра и инициирующий формирование трех транскрипционных факторов — NF-AT, NF- $\kappa$ B и AP-1 [1].

Таким образом, сигнализация через TCR регулирует гомеостаз и эффекторные функции T-клеток.

Однако все молекулы, участвующие в трансдукции сигнала с TCR, и их взаимодействие, определяющее конкретные функции клеток, остаются не до конца изученными. Особый ин-

терес представляет исследование отличительных особенностей передачи сигналов TCR в регуляторных Т-клетках (Treg), которые могут объяснять некоторые из их уникальных функциональных характеристик по сравнению с другими Т-лимфоцитами: Т-клетками центральной памяти (TCM) и эффекторными субпопуляциями Т-клеточной памяти (TEM и TEMRA). В условиях *in vitro* принято активировать Т-клетки при помощи частиц, имитирующих присутствие АПК за счет сорбированных антител к CD3 и CD28, а также зачастую и CD2. Вследствие внесения активирующих частиц формируется иммунный синапс, и регулируются такие процессы, как активация, дифференцировка и пролиферация лимфоцитов. Такой подход позволяет в контролируемых условиях исследовать разные аспекты функционирования Т-клеток. В связи с повышенным интересом исследователей к малым субпопуляциям Т-лимфоцитов (Treg, TCM, TEM, TEMRA), целью работы являлась оценка самостоятельного эффекта TCR-активации на их дифференцировку.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось согласно Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 12.06.2016.

В работе использовали мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) доноров, которыми являлись здоровые доноры (n=11). МПК получали центрифугированием в градиенте плотности смеси фикола-верографина (1,077 г/см<sup>3</sup>). Монокультуры CD4<sup>+</sup> Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>) получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS® («Miltenyi Biotec»<sup>TM</sup>, Германия) из суспензии МПК. Выделенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки культивировали в 96-луночных планшетах (в концентрации 10<sup>6</sup> кл/мл) в полной питательной среде в течение 48 или 72 часов при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали T-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp) («Miltenyi Biotec»<sup>TM</sup>, Германия) — частицы MACSiBead<sup>TM</sup>, покрытые антителами к CD2, CD3, CD28 человека. Кроме этого, в культуры вносили IL-2 (10 нг/мл, «Miltenyi Biotec»<sup>TM</sup>, Германия). Реагент Ac/Exp добавляли в пробы по 5 мкл, и, в конечном итоге, каждая проба

содержала 0,5\*10<sup>6</sup> MACSiBead<sup>TM</sup> частиц. Соотношение клеток и активирующих частиц составляло 2:1

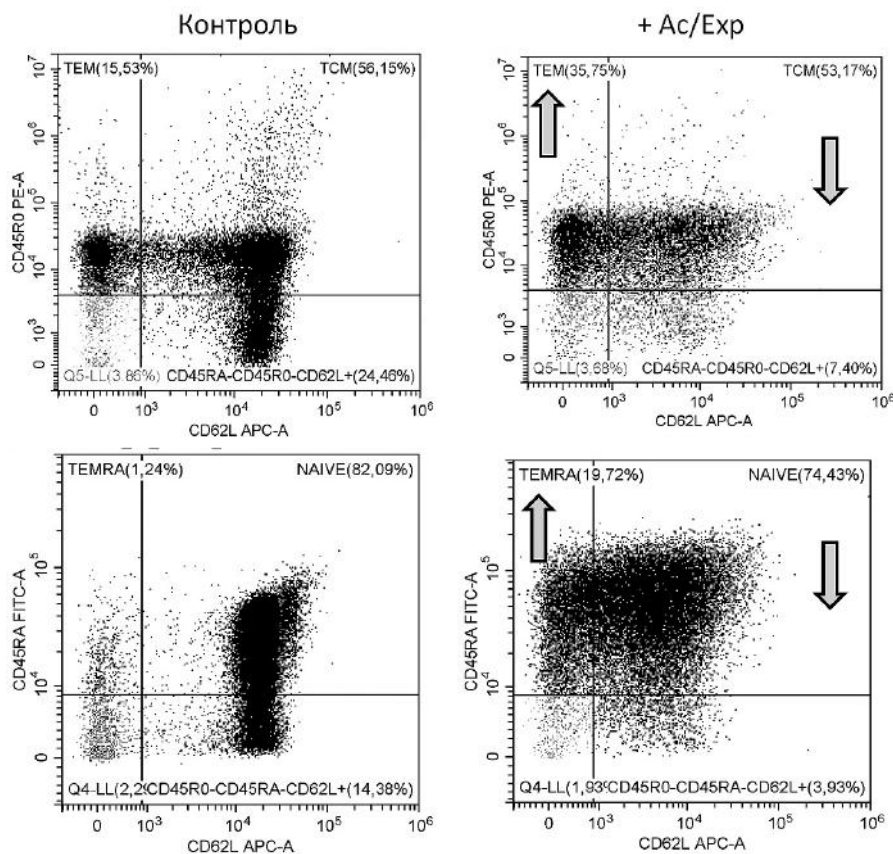
После 48 ч инкубации осуществляли определение поверхностных молекул, характеризующих субпопуляции наивных Т-клеток (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>), Т-клеток центральной памяти — TCM (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45R0<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>), претерминально-дифференцированных Т-эффекторов — TEM (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45R0<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) и терминально-дифференцированных эффекторов — TEMRA (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) [2]. Использовали антитела CD62L-APC (clone 145/15), CD4-PerCP (clone M-T466) («Miltenyi Biotec»<sup>TM</sup>, Германия), CD45RA-FITC (clone HI100) и CD45R0-PE (clone UCHL1) («BioLegend», США).

После 72 ч оценивали экспрессию маркеров Treg (CTLA4, HELIOS и FOXP3) по стандартному двухэтапному протоколу с пермеабелизацией клеток (Anti-Human CTLA4-PE, Anti-FOXP3-PerCP-Cyanine 5.5 («eBioscience», США), Anti-HELIOS-FITC («Miltenyi Biotec»<sup>TM</sup>, Германия).

Исследование проводили на проточном цитометре «CytoFLEX S» («Beckman Coulter», США), полученные данные обрабатывали в программе CytExpert 2.0. («Beckman Coulter», США). Данные представлены в виде процента наивных Т-клеток, TCM, TEM, TEMRA и Treg от количества клеток в гейте CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 8.0 при помощи критерия Вилкоксона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частицы, имитирующие АПК (Ac/Exp), взаимодействуют с Т-клетками через молекулы CD2, CD3 и CD28, формируя иммунный синапс, вследствие чего регулируются активация, дифференцировка и пролиферация лимфоцитов. На дендритных клетках естественным лигандом для CD2 является CD58 (LFA-3, молекула клеточной адгезии), для CD28 — CD80/86 (костимулирующие молекулы B7), а для CD3 в ассоциации с CD4 — MHC-II [3]. Молекула CD45 (в силу своего размера) на время формирования синапса выводится из лидирующего участка, однако затем она участвует в проведении активирующего сигнала. Известно, что дифференцировка Т-клеток затрагивает структуру внеклеточного домена CD45: в наивных клетках это полная форма (CD45RA, 220 кДа), однако по мере антигензависимой дифференцировки ряд доменов теряется, а продукт конечной модификации обо-



**Рис. 1.** Влияние TCR-активатора (Ac/Exp) на конверсию наивных T-хелперов в TCM, TEM и TEMRA на примере одного эксперимента.

*Примечание:* Вверху – двухпараметрические графики, отображающие процентное содержание TEM и TCM от CD45RA<sup>-</sup> субпопуляции. Внизу – двухпараметрические графики, отображающие процентное содержание TEMRA и NAIVE от CD45RO<sup>-</sup> субпопуляции.

значают как CD45RO (180 кДа). T-лимфоциты, экспрессирующие CD45RA, позиционируются как «наивные» T-клетки (NAIVE), а экспрессирующие CD45RO – как antigen-experienced, или «примированные» T-клетки памяти [2]. Высоко дифференцированные T-клетки памяти способны реэкспрессировать на клеточной поверхности CD45RA, что связано с состоянием терминальной дифференцировки клетки. Помимо этого, трансформация клеток связана с изменением экспрессии молекул L-селектина (CD62L), которые взаимодействуют с лигандами GlyCAM, PSGL-1 и CD34 на поверхности эндотелия и участвуют в транслокации клеток в лимфатические узлы [4].

Показано, что TCR-активация CD4<sup>+</sup>-клеток приводила к достоверному снижению количества наивных T-клеток и TCM, но повышению количества T-эффекторов (TEM, TEMRA), что свидетельствует об адекватной активации CD4<sup>+</sup>-клеток в представленной экспериментальной модели (таблица 1). Известно, что часть наивных T-клеток после контакта с антигеном претерпевает конверсию в TCM, которые не проявляют эффекторных функций, но могут быстро ответить на антиген при повторной стимуляции.

Другая часть пула клеток памяти трансформируется в TEM и TEMRA. Как TEM, так и TEMRA, секретируют цитокины, прежде всего ИЛ-4 и ИФН-γ, а также другие биологически активные молекулы. Очевидно, что TCR-активация клеток привела к перераспределению клеток в сторону эффекторных субпопуляций, что является естественным ответом клеток (рис. 1).

В отношении Treg показано, что TCR-активация приводила к существенному повышению экспрессии маркеров Treg (FOXP3, HELIOS, CTLA-4), что свидетельствует о дифференцировке этой субпопуляции клеток, а также о повышении ее функциональной активности (таблица 2). Основным транскрипционным фактором Treg является FOXP3 (forkhead box P3), а функциональная активность этих клеток ассоциирована с поверхностной экспрессией CTLA4 (цитотоксический антиген T-лимфоцитов 4). Помимо этого, транскрипционный фактор HELIOS также относится к маркерам активированных Treg. На данный момент предполагается, что HELIOS характеризует Treg тимического происхождения и регулирует IL-2 в этих клетках [5].

Стоит отметить, что в последнее время для изучения различий между процессами TCR-ак-

**Таблица 1.** Влияние TCR-активации на конверсию наивных Т-хелперов в Т-клетки центральной памяти (TCM) и эффекторные субпопуляции Т-клеток памяти (TEM и TEMRA) (n=12, Ме (Q1–Q3))

		NAIVE (%)	TCM (%)	TEM (%)	TEMRA (%)
1	Контроль	55,64 (52,30–60,89)	29,81 (20,61–31,00)	7,42 (5,45–8,26)	0,88 (0,74–1,00)
2	Контроль+Ас/Ехр	46,77 (41,39–54,27) P <sub>(1–2)</sub> <0,05	23,62 (16,82–27,77) P <sub>(1–2)</sub> <0,05	11,10 (6,45–13,18) P <sub>(1–2)</sub> <0,05	5,56 (3,81–7,87) P <sub>(1–2)</sub> <0,05

*Примечание:* Представлен процент клеток от общего количества лимфоцитов. Здесь и в табл. 2 показаны достоверные по W-критерию Вилкоксона различия (P<0,05).

**Таблица 2.** Влияние TCR-активации на экспрессию маркеров Treg активированными CD4<sup>+</sup>-клетками (n=8, Ме (Q1–Q3))

		CTLA4 <sup>+</sup>	HELIOS <sup>+</sup>	FOXP3 <sup>+</sup>	FOXP3 <sup>+</sup> HELIOS <sup>+</sup>
1	Контроль	0,012 (0,000–0,034)	0,112 (0,013–0,135)	0,567 (0,231–0,751)	0,020 (0,000–0,053)
2	Контроль+Ас/Ехр	0,045 (0,015–0,095) P <sub>(1–2)</sub> <0,05	0,255 (0,100–0,595) P <sub>(1–2)</sub> <0,05	1,300 (0,685–1,667) P <sub>(1–2)</sub> <0,05	0,090 (0,040–0,157) P <sub>(1–2)</sub> <0,05

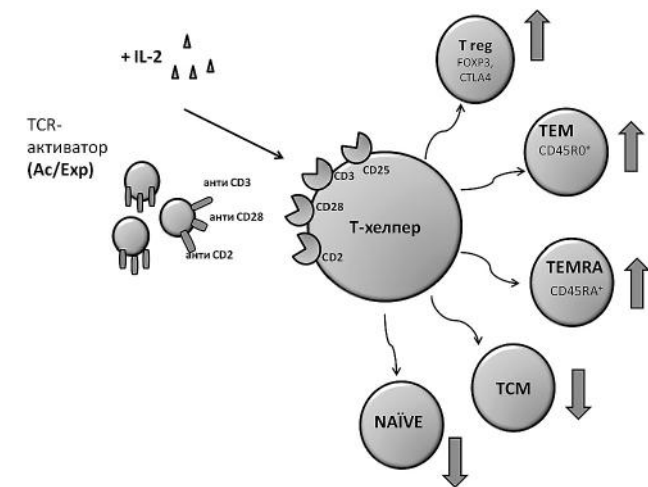
тивации в разных типах клеток применяют методы протеомики, которые позволяют оценить целостную реакцию клетки на активацию [6]. Так, в 2018 г. показано, что в разных типах Т-клеток различается профиль белков, ассоциированных с цитоскелетной организацией и молекулярным транспортом (т.н. дифференциальная фосфопротеомика). В частности, обнаружено фундаментальное различие между Treg и другими Т-хелперами – в Treg после формирования иммунного синапса был нарушен синтез ключевых сигнальных интермедиатов (CD3ε, Lck, SLP76 и PLCγ1), а некоторые из этих промежуточных продуктов, включая CD3ε, PLCγ1 и Zap70, были

обнаружены в меньших количествах в Treg [6]. Помимо этого, разная реакция клеток на TCR-активацию также связана с пространственно-временной организацией сигнальных путей иммунного синапса в разных типах Т-клеток [7]. Так, известно, что длительность взаимодействия Treg с дендритными клетками выше, чем у наивных Т-клеток. По-видимому, это связано с экспрессией нейропиллина-1 на поверхности Treg, что способствует длительному взаимодействию с дендритными клетками, и приводит к более высокой чувствительности к предельным количествам антигена [7].

Таким образом, при изучении TCR-активации в формировании малых субпопуляций Т-лимфоцитов-хелперов показано, что происходило перераспределение пулов клеток в пользу эффекторных субпопуляций (TEM, TEMRA), и одновременно снижалось количество наивных Т-клеток и TCM (рис. 2). В отношении Treg продемонстрировано, что TCR-активация клеток приводила к повышению внутриклеточной экспрессии FOXP3, HELIOS, CTLA-4. В целом, присутствие TCR-активатора приводит к повышению количества эффекторных Т-хелперов, которое сопровождается одновременным повышением уровня супрессорных Treg.

**БЛАГОДАРНОСТИ**

Работа выполнена в рамках государственного задания, N госрегистрации темы: 01201353248.



**Рис. 2.** Обобщенные результаты эксперимента по влиянию TCR-активатора на субпопуляции Т-хелперов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Ярилин А. А. Иммунология. ГОЭТАР-Медиа (Москва) 2010, С. 752. [Yarilin A. A. Immunology. GO-ETAR-Media (Moscow) 2010, 752. Russian.]
2. Кудрявцев И. В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки. Российский иммунологический журнал. 2014, 8(4), 947–964. [Kudryavtsev I. V. T-cells of memory: the main populations and stages of differentiation. Russian Immunological Journal. 2014, 8(4), 947–964. Russian.]
3. Huppa J. B., Davis M. M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. Nat Rev Immunol. 2003. 12 (suppl.), 973–983.
4. Литвинова Л. С., Гуцол А. А., Сохоневич Н. А., Кофанова К. А., Хазиахматова О. Г. и соавт. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов. Медицинская иммунология, 2014, 6(1), 7–26. [Litvinova L. S., Gutsol A. A., Sohonevich N. A., Kofanova K. A., Khaziahmatova O. G. et al. The main surface markers of the functional activity of T-lymphocytes. Medical immunology, 2014, 6(1), 7–26. Russian.]
5. Thornton A. M., Korty P. E., Tran D. Q., Wohlfert E. A., Murray P. E. et al. Belkaid Y., Shevach E. M. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. J. Immunology. 2010. 184 (7), 3433–3441.
6. Chatila T. A., De Palma R. A simple twist of phosphate: Immunological synapse formation and T cell receptor signaling outcome in regulatory T cells. Eur J Immunol. 2017, 47(12), 2039–2042.
7. Sarris M., Betz A. G. Live Imaging of Dendritic Cell–Treg Cell Interactions. In: Kassiotis G., Liston A. (eds) Regulatory T Cells. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 707. Humana Press, Totowa, NJ, 83–101.

## THE ROLE OF TCR-ACTIVATION IN THE FORMATION OF SMALL SUBPOPULATIONS OF T HELPERS

© 2018 V. P. Timganova, S. A. Zamorina, M. S. Bochkova,  
P. V. Khrantsov, M. B. Rayev

«Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS», Perm, Russia

Received: 11.05.2018. Accepted: 20.06.2018

The role of the independent effect of TCR-activation in the formation of small subpopulations of T-helpers (Treg, TCM, TEM, TEMRA) was studied. It was shown that under the conditions of TCR activation, cells were redistributed in favor of effector subpopulations (TEM, TEMRA), while the number of naive T cells and TCM decreased. What about Treg, it was demonstrated that TCR-activation of cells resulted in increased intracellular expression of FOXP3, HELIOS and CTLA-4. In general, the presence of the TCR-activator leads to an increase in the number of effector T-helpers, which is accompanied by a simultaneous increase in the level of suppressive Treg.

*Key words:* TCR, T-helpers, Treg, memory T cells, naive T cells, T cells of central memory

**Authors:**

**Timganova V. P.**, ☒ PhD (Biology), junior researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia;

614081, Perm, Goleva str., 13, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS». Phone: +79028361455, 8(342)2807794.

**E-mail:** timganovavp@gmail.com

**Zamorina S. A.**, PhD, MD (Biology), leading researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia;

**Bochkova M. S.**, PhD (Biology), researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia;

**Khrantsov P. V.**, PhD (Biology), junior researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia;

**Rayev M. B.**, PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Ecological Immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia.