

УДК 571.27

## ФОРМИРОВАНИЕ УНИКАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ CD8+ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ СИНГЕННЫХ СПЛЕНОЦИТОВ МЫШАМ С ЛИМФОПЕНИЕЙ

© 2021 г. Ю. Ю. Силаева<sup>1,\*,#</sup>, А. А. Калинина<sup>2,#</sup>, Л. М. Хромых<sup>2</sup>, А. В. Дейкин<sup>1,3</sup>, Д. Б. Казанский<sup>2</sup>

Представлено академиком РАН П.Г. Георгиевым

Поступило 10.11.2020 г.

После доработки 25.11.2020 г.

Принято к публикации 27.11.2020 г.

В условиях лимфопении Т-лимфоциты пролиферируют и приобретают поверхностный активационный фенотип, во многом похожий на фенотип истинных Т-клеток памяти. Мы исследовали фенотипические особенности популяции CD8+ Т-клеток, формирующейся из лимфоцитов донора после адоптивного переноса сингенных спленоцитов сублетально облученным мышам. Указанная популяция экспрессирует маркеры CD44, CD122, CD5, CD49d и хемокиновый рецептор CXCR3. Таким образом, впервые продемонстрирован феномен формирования популяции Т-клеток с признаками супрессорных CD8+ Т-лимфоцитов и истинных клеток памяти.

**Ключевые слова:** суррогатная Т-клетка памяти, лимфопения, ТКР, CD44, CD62L, CD5, CD122, CD49d, CXCR3

**DOI:** 10.31857/S2686738921020244

В условиях лимфопении в организме возникают популяции суррогатных CD8+ Т-клеток памяти, по фенотипу похожих на истинные клетки памяти (“memory-like” CD8+, T<sub>ML</sub>) [1–4]. Данные первоначальных экспериментов позволяли предполагать, что формирующаяся в условиях лимфопении популяция T<sub>ML</sub> повторяет фенотипические особенности истинных клеток памяти и может заменить их в иммунном ответе [5, 6]. Однако накапливаются доказательства того, что T<sub>ML</sub> схожи с истинными клетками памяти по профилю экспрессии поверхностных маркеров; вместе с тем

имеются ключевые отличия. Так, экспрессия рецепторов хемокинов в T<sub>ML</sub> отличается от таковой в истинных клетках памяти [7]. Описаны популяции T<sub>ML</sub> с иммуносупрессорной активностью [8]. Более того, при лимфопении клоны Т-клеток с рецепторами высокоаффинного взаимодействия с собственными молекулами МНС (по существу, аутореактивные Т-клетки) пролиферируют и экспрессируют поверхностные маркеры клеток памяти [9, 10]. В настоящей работе исследован фенотип популяции CD8+ лимфоцитов, образующейся при адоптивном переносе сингенных спленоцитов мышам-реципиентам с лимфопенией после сублетального облучения.

Использованы мыши линий C57BL/6 (K<sup>b</sup>I-A<sup>b</sup>D<sup>b</sup>) и C57BL/6-TgN(АСТ<sup>b</sup>EGFP)1Osб (K<sup>b</sup>I-A<sup>b</sup>D<sup>b</sup>) (далее В6.GFP, <https://www.jax.org/strain/003291>) (разведение вивария НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина). В организме мышей линии В6.GFP GFP экспрессируется конститутивно под контролем куриного промотора бета-актина и цитомегаловирусного энхансера. Не зафиксировано отличий в функционировании иммунной системы трансгенных животных по сравнению с диким типом, что позволило использовать данную линию в экспериментах. Экспериментальные протоколы одобрены этической комиссией Института биологии гена РАН. Самок мышей C57BL/6 сублетально облучали (4.5 Гр однократно) на аппарате “Агат-Р” (Россия), источ-

# равный вклад авторов.

<sup>1</sup> Центр коллективного пользования Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Институт биологии гена” Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

<sup>3</sup> Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Институт биологии гена” Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: silaeva@genebiology.ru

ник  $\gamma$ -излучения  $Co^{60}$  с начальной мощностью  $1.9 \times 10^{14}$  Бк). Животных выводили из эксперимента на 10-й день после облучения, извлекали селезенки и гомогенизировали в фосфатно-солевом буфере при  $4^\circ C$ . Спленциты осаждали центрифугированием (200 g, 5 мин). Эритроциты обрабатывали лизирующим буфером (BD Pharmingen, США). Мононуклеары трижды промывали фосфатно-солевым буфером и использовали для окрашивания моноклональными антителами и адоптивного переноса.

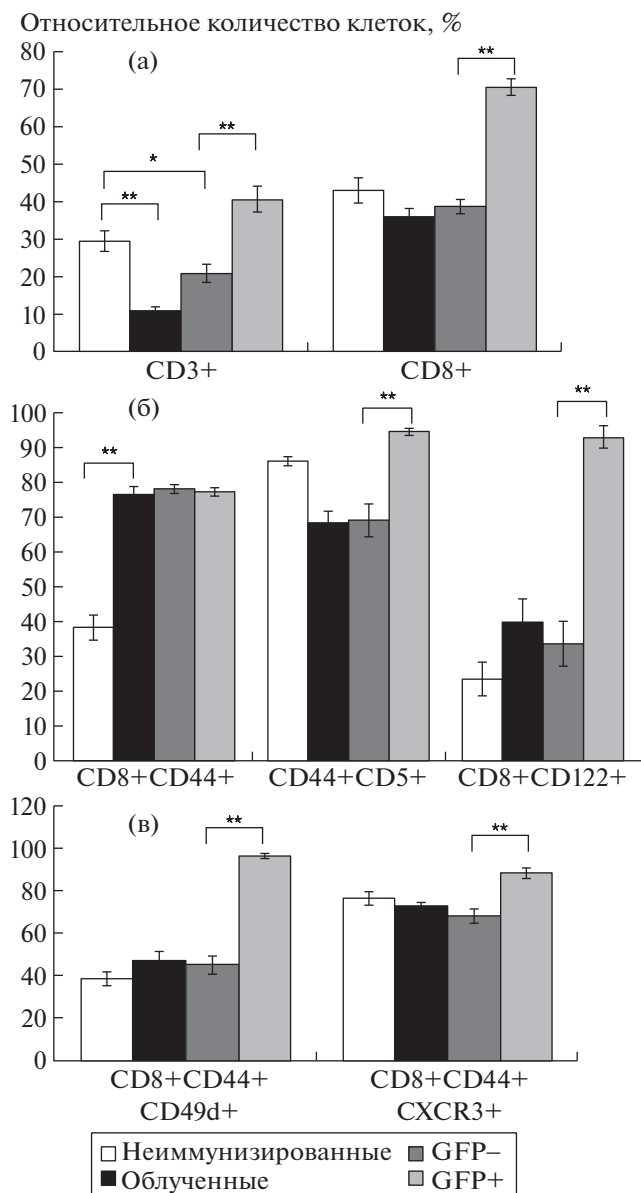
Использовали моноклональные антитела, конъюгированные с соответствующими флуоресцентными метками: PerCP-Cy5.5 – анти-CD8 $\alpha$  (клон 53–6.7, BD Bioscience, США), APC-Cy7 – анти-CD62L (клон MEL-14, eBioscience, США), APC – анти-CD44 (клон IM7, eBioscience), PE-Cy7 – анти-CD3 (клон 145-2C11, eBioscience), PE – анти-CD122 (клон TM- $\beta$ 1, BD Bioscience), BV421 – анти-CD5 (клон 53-7.3, BD Biosciences), BV421 – анти-CXCR3 (клон CXCR3-173, BD Biosciences), PE – анти-CD49d (R1-2, BD Biosciences).

Адоптивный перенос осуществляли следующим образом: неиммунизированных мышей C57BL/6 облучали в дозе 4.5 Гр. Через 24 ч после облучения мышам внутривенно (в/в) вводили  $1.5 \times 10^7$  спленцитов неиммунизированных сингенных животных или фосфатно-солевой буфер (контроль). Через 10 дней спленциты мышей-реципиентов использовали для цитофлуориметрического анализа. Спленциты ( $3 \times 10^6$ ) инкубировали с блокирующими антителами Fc block (клон 2.4G2, BD Pharmingen, США; 10 мин  $4^\circ C$ ), окрашивали флуоресцентно мечеными антителам (40 мин,  $4^\circ C$ ) и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Bioscience) в программе FACSDiva 6.0 (BD Bioscience). Для характеристики популяций периферических Т-клеток анализировали не менее  $10^6$  событий в каждом образце. Обработку данных проводили в программе Flow Jo 7.6 (TreeStar Inc., США). Результаты представлены как средняя величина  $\pm$  стандартная ошибка ( $M \pm SEM$ ). Статистический анализ проводили с использованием непарного критерия Стьюдента. Различия признавали значимыми при  $p \leq 0.05$ .

Обнаружено значительное увеличение относительного количества CD3+ лимфоцитов в селезенке мышей-реципиентов (рис. 1а). Кроме того, доля CD8+ Т-клеток также значительно возросла у мышей-реципиентов по сравнению с неиммунизированным контролем и сублетально облученными животными (рис. 1а). Это означает, что при адоптивном переносе сингенных спленцитов пролиферируют в основном CD8+ Т-клетки. Это согласуется с результатами исследований, показавших, что CD8+ клетки нуждаются в мень-

шем наборе стимулов для гомеостатической пролиферации по сравнению с CD4+ Т-лимфоцитами [11]. Практически все CD8+ Т-лимфоциты как донора, так и реципиента приобрели фенотип CD44+, как и ожидали в условиях лимфопении (рис. 1б). При этом доля потенциально аутореактивных клеток CD8+CD44+CD5+ в популяции лимфоцитов донора была достоверно выше, чем среди лимфоцитов реципиента (рис. 1б). Также значительно возросла доля CD8+CD122+ Т-клеток среди Т-лимфоцитов донора по сравнению с аналогичными популяциями реципиента, неиммунизированных и сублетально облученных мышей (рис. 1б). Отмечено достоверное увеличение доли Т-клеток, экспрессирующих CD49d в популяции клеток донора по сравнению с Т-лимфоцитами реципиента (рис. 1в). Помимо этого, относительное количество Т-лимфоцитов донора, экспрессирующих хемокиновый рецептор CXCR3, было достоверно выше, чем доля таких лимфоцитов в популяции Т-клеток реципиента (рис. 1в).

Таким образом, при адоптивном переносе сингенных спленцитов в селезенке сублетально облученного реципиента формируется популяция донорских Т-клеток с уникальными фенотипическими характеристиками – одновременной экспрессией маркеров истинных клеток памяти и супрессоров CD8+. Мы полагаем, что поверхностный фенотип, приобретенный Т-лимфоцитами донора в условиях лимфопении, может быть связан с недостатком или избытком сигналов, получаемых Т-лимфоцитами при взаимодействии Т-клеточного рецептора с собственными МНС/пептидными комплексами. Нами показано, что конкуренция за взаимодействие с собственными комплексами МНС-пептид среди Т-лимфоцитов, несущих трансгенную  $\beta$ -цепь ТКР, в мышях линии 1D1b приводит к изменению поверхностного активационного фенотипа по сравнению с Т-клетками этих же животных, экспрессирующих эндогенную  $\beta$ -цепь ТКР [12]. В нашей экспериментальной системе наивные клетки донора могут получать преимущество в связи с высоким уровнем экспрессии молекулы CD5, особенно ввиду того, что значительная часть наивных клеток реципиента погибла в результате сублетального облучения. Кроме того, в формировании обнаруженной популяции большое значение могут иметь изменения в микроокружении Т-лимфоцитов донора, возникшие в результате адоптивного переноса спленцитов в венозное русло реципиента. Однако вне зависимости от причин, вызвавших появление такого профиля экспрессии поверхностных маркеров, наиболее важным остается вопрос о функциональных характеристиках обнаруженной популяции: способны ли они осуществлять полноценный иммунный ответ или представляют собой популяцию супрессорных Т-клеток? В последнем



**Рис. 1.** Относительное количество популяций Т-лимфоцитов в селезенке сублетально облученных мышей-реципиентов после адаптивного переноса сингенных спленоцитов. а – Относительное количество CD3+ и CD3+CD8+ Т-клеток в селезенке сублетально облученных реципиентов. Представлены данные для контрольных групп (неиммунизированные, облученные), отдельно для клеток реципента (GFP-) и донора (GFP+). Здесь и на рис. 1а–1б: данные получены в трех независимых экспериментах, 4–6 животных в каждой группе. Для статистического анализа использовали *t*-критерий Стьюдента (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ ). б – Относительное количество CD8+CD44+, CD44+CD5+ и CD8+CD122+ Т-клеток в селезенке сублетально облученных реципиентов. в – Относительное количество CD8+CD44+CD49d+ и CD8+CD44+CXCR3+ Т-клеток в селезенке сублетально облученных реципиентов.

варианте полученные результаты могут иметь практическое значение для практики переливания крови и пересадки костного мозга, поскольку подобные популяции могут формироваться у пациентов [13], поэтому изучение функциональных характеристик обнаруженной популяции чрезвычайно важно и станет предметом наших дальнейших исследований.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Мегагрантом (Договор №14.W03.31.0020 между Министерством науки и высшего образования Российской Федерации и Федеральным государственным бюджетным учреждением науки “Институт биологии гена” Российской академии наук). Использовано оборудование Центра коллективного пользования ФГБУН ИБГ РАН при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cho B.K., Rao V.P., Ge Q., Eisen H.N., & Chen J.* Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells // *The Journal of experimental medicine*. 2000. V. 192. № 4. P. 549–556.
2. *Goldrath A.W., Bogatzki L.Y., & Bevan M.J.* Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation // *The Journal of experimental medicine*. 2000. V. 192. № 4. P. 557–564.
3. *Murali-Krishna K., & Ahmed R.* Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells // *Journal of immunology*. 2000. V. 165. № 4. P. 1733–1737.
4. *Stephen C. Jameson, You Jeong Lee, and Kristin A. Hogquist* Innate Memory T cells // *Adv Immunol.* 2015. V. 126. P. 173–213. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2014.12.001>
5. *Moxham V.F., Karegli J., Phillips R.E., Brown K.L., Tapmeier T.T., Hangartner R., Sacks S.H., Wong W.* Homeostatic proliferation of lymphocytes results in augmented memory-like function and accelerated allograft rejection // *Journal of immunology*. 2008. V. 180. № 6. P. 3910–3918.
6. *Steve Oghumu, Cesar A. Terrazas, Sanjay Varikuti, Jennifer Kimble, Stephen Vadia, Lianbo Yu, Stephanie Seveau, and Abhay R. Satoskar.* CXCR3 expression defines a novel subset of innate CD8+ T cells that enhance immunity against bacterial infection and cancer upon stimulation with IL-15 // *FASEB J*. 2015. V. 29. P. 1019–1028.
7. *Cheung K.P., Yang E., & Goldrath A.W.* Memory-like CD8+ T cells generated during homeostatic proliferation defer to antigen-experienced memory cells // *Journal of immunology*. 2009. V. 183. V. 5. P. 3364–3372. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900641>
8. *Wang L.X., Li Y., Yang G., Pang P., Haley D., Walker E.B., Hu H.M.* CD122+ CD8+ Treg suppress vaccine-induced antitumor immune responses in lymphodepleted

- mice // *European journal of immunology*. 2010. V. 40. № 5. P. 1375–1385.  
<https://doi.org/10.1002/eji.200839210.CD122>
9. *Le Campion A., Gagnerault M., Auffray C., Bécourt C., Poitrasson-Rivière M., Lallemand E., Lucas B.* Lymphopenia-induced spontaneous T-cell proliferation as a cofactor for autoimmune disease development // *Blood*. 2009. V. 114. № 9. P. 1784–1793.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-192120>
  10. *Jason T. White, Eric W. Cross, Matthew A. Burchill, Thomas Danhorn, Martin D. McCarter, Hugo R. Rosen, Brian O'Connor & Ross M. Kedl.* Virtual memory T cells develop and mediate bystander protective immunity in an IL-15-dependent manner // *Nat Commun*. 2016. V. 7. P. 11291.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms11291>
  11. *Hickman S.P., Turka L.A.* Homeostatic T cell proliferation as a barrier to T cell tolerance // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005. V. 360. № 1461. P. 1713–1721.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1699>
  12. *Silaeva Y.Y., Kalinina A.A., Vagida M.S., Khromykh L.M., Deikin A.V., Ermolkevich T.G., Sadchikova E.R., Goldman I.L., Kazansky D.B.* Decrease in pool of T lymphocytes with surface phenotypes of effector and central memory cells under influence of TCR transgenic  $\beta$ -chain expression. // *Biochemistry (Mosc)*. 2013. V. 78. № 5. P. 549–559.  
<https://doi.org/10.1134/S0006297913050143>
  13. *Luc Van Kaer.* Innate and virtual memory T cells in man. // *Eur J Immunol*. 2015. V. 45. № 7. P. 1916–1920.  
<https://doi.org/10.1002/eji.201545761>

## FORMATION OF A UNIQUE POPULATION OF CD8 + T-LYMPHOCYTES AFTER ADOPTIVE TRANSFER OF SYNGENEIC SPLENOCYTES TO MICE WITH LYMPHOPENIA

**Y. Yu. Silaeva<sup>a,\*,#</sup>, A. A. Kalinina<sup>b,#</sup>, L. M. Khromykh<sup>b</sup>,  
A. V. Deykin<sup>a,c</sup>, and D. B. Kazansky<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> *Core Facility Centre, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Federal State Budgetary Institution “N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

<sup>c</sup> *Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

\*e-mail: [silaeva@genebiology.ru](mailto:silaeva@genebiology.ru)

Presented by Academician of the RAS P.G. Georgiev

Under <sup>1</sup>lymphopenia conditions, T-lymphocytes proliferate and acquire an activation phenotype like that of true memory T-cells. We investigated the surface phenotype of the CD8+ T-cell population formed from donor lymphocytes after adoptive transfer of syngeneic splenocytes to sublethally irradiated C57BL/6 mice. This population expresses CD44, CD122, CD5, CD49d antigens and the chemokine receptor CXCR3. Thus, we demonstrated, for the first time, that T-cells with simultaneous expression of the markers of suppressor CD8+ T-lymphocytes and true memory cells can be generated in the lymphopenic organism.

**Keywords:** virtual memory T-cell, lymphopenia, TCR, CD44, CD62L, CD5, CD122, CD49d, CXCR3

# Equal contribution.