

СОКРАЩЕНИЕ ПУЛА Т-ЛИМФОЦИТОВ С ПОВЕРХНОСТНЫМ ФЕНОТИПОМ ЭФФЕКТОРОВ И КЛЕТОК ПАМЯТИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНА β -ЦЕПИ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА

© 2013 г. Ю.Ю. Силаева¹, А.А. Калинина¹, М.С. Вагида¹, Л.М. Хромых¹,
А.В. Дейкин², Т.Г. Ермолкевич², Е.Р. Садчикова², И.Л. Гольдман²,
Д.Б. Казанский^{1*}

¹ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАО,
Москва 115478, Каширское ш., 24; электронная почта: kazansky1@yandex.ru

² Институт биологии гена РАН, Москва 119334, ул. Вавилова, 34/5

Поступила в редакцию 14.01.13

После доработки 25.02.13

Периферические Т-лимфоциты могут быть подразделены на две группы – наивные и активированные антигеном, которые, в свою очередь, представлены эффекторами и клетками памяти. Обычно их идентифицируют на основании различий в профилях экспрессии активационных маркеров, например, CD44 и CD62L у мышей. Наличие или отсутствие этих маркеров определяет пути рециркуляции Т-клеток в организме, но может неточно отражать реальный «опыт» Т-лимфоцита по отношению к активации чужеродным антигеном. Механизмы, поддерживающие гомеостаз субпопуляций Т-клеток с различным поверхностным активационным фенотипом, остаются во многом неизвестными. С целью исследования влияния генетической структуры цепей Т-клеточного рецептора (TCR) на формирование Т-лимфоцитов в тимусе и поддержание их различных субпопуляций на периферии, нами получена линия трансгенных мышей на генетической основе B10.D2(R101) с экспрессией трансгена β -цепи TCR 1D1, принадлежащей к семейству V β 6. Развитие Т-клеток в тимусе таких трансгенных животных не нарушено. Репертуар периферических Т-лимфоцитов у этих животных на 70–80% состоит из Т-клеток, экспрессирующих трансген, и на 20–30% – из Т-лимфоцитов, несущих β -цепи эндогенного происхождения. Соотношения периферических Т-лимфоцитов CD4⁺CD8⁻ и CD4⁻CD8⁺ у трансгенных животных не изменены, но в обеих субпопуляциях повышена доля клеток с фенотипом наивных Т-лимфоцитов CD44⁻CD62L⁺, тогда как уровни Т-лимфоцитов с фенотипами эффекторов CD44⁺CD62L⁻ и клеток памяти CD44⁺CD62L⁺ снижены. Напротив, Т-лимфоциты трансгенных животных, несущие эндогенные β -цепи TCR, имеют фенотип активированных Т-клеток CD44⁺. Таким образом, мы впервые показали, что размеры пулов Т-лимфоцитов с различным поверхностным активационным фенотипом зависят от структуры Т-клеточных рецепторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Т-клеточный рецептор, трансгенные животные, лимфоцит, эффектор, клетка памяти.

Среди периферических Т-лимфоцитов присутствуют несколько субпопуляций Т-клеток с различными функциональными характеристиками: наивные Т-лимфоциты, не встречавшие ранее специфический антиген; эффекторы – Т-лимфоциты, активированные при встрече с антигеном, функции которых нацелены на его устранение, и клетки памяти – оставшийся по окончании иммунного ответа небольшой пул Т-клеток, способных к ускоренному ответу на тот же антиген. На практике эти типы клеток идентифицируют по наличию на их поверхности активационных поверхностных маркеров, например, у мышей – CD44 и CD62L, определяющие,

соответственно, способность к миграции в нелимфоидные ткани и способность к миграции через специализированный высокий эндотелий лимфатических узлов [1, 2]. В ходе иммунного ответа наивные Т-лимфоциты CD44⁻CD62L⁺ действительно приобретают поверхностный фенотип эффекторов CD44⁺CD62L⁻ и затем клеток памяти CD44⁺CD62L⁺. Тем не менее, неясно, отражает ли экспрессия этих маркеров реальный статус функционирования Т-клетки как эффектора или клетки памяти. Например, приобретение фенотипа клеток памяти может происходить без встречи со специфическим антигеном и в условиях лимфопении [3–6], но данные о функциональной активности таких Т-клеток крайне противоречивы [7, 8]. Поэтому вопрос о

* Адресат для корреспонденции.

механизмах, лежащих в основе приобретения Т-лимфоцитом того или иного поверхностного фенотипа, остается открытым.

Хорошо известно, что гомеостаз наивных Т-лимфоцитов поддерживается тоническими сигналами, которые они получают при взаимодействии со «своими» комплексами МНС–пептид в ходе рециркуляции через лимфоидные ткани [9]. Мы предположили, что профиль активационных поверхностных маркеров Т-лимфоцитов также может определяться взаимодействиями Т-клеточного рецептора с собственными молекулами МНС. В пользу этой гипотезы говорит тот факт, что для рецепторов Т-клеток памяти характерна более высокая аффинность взаимодействия со специфическим лигандом, чем для наивных Т-клеток, специфичных к тому же антигену [10]. Известно также, что лимфопения, приводящая к приобретению Т-лимфоцитами фенотипа активированных Т-клеток, часто провоцирует развитие аутоиммунных заболеваний [11, 12]. Экспериментально проверить эту гипотезу можно на животных с измененным репертуаром Т-клеточных рецепторов, в частности, животных с трансгенным TCR. Существующим моделям с трансгенным TCR α/β присущ ряд недостатков, которые становятся серьезным препятствием для использования в исследованиях гомеостаза Т-лимфоцитов. В числе таких недостатков – глубокие нарушения характера дифференцировки Т-лимфоцитов в тимусе и нефизиологически высокое содержание Т-лимфоцитов с одинаковой специфичностью, что вынуждает экспериментаторов использовать инвазивные методы и схемы экспериментов, в частности – адаптивные переносы трансгенных Т-клеток лимфопеничным животным дикого типа. Это побудило нас создать собственную трансгенную модель, в которой трансген кодирует одну из цепей TCR клеток памяти, допуская нормальную реаранжировку другой цепи и формирование разнообразного репертуара Т-лимфоцитов.

Ранее мы нашли эффективный способ вызывать селективный ответ клеток памяти, специфичных к аллогенным молекулам МНС класса I без сопутствующей активации и вовлечения в ответ клонов наивных Т-лимфоцитов [13]. Для этого мы использовали смешанную культуру лимфоцитов животных, предварительно иммунизированных клетками аллогенных опухолей, в качестве отвечающих Т-лимфоцитов и аллогенные спленоциты, убитые острым тепловым шоком (45°, 1 ч), в качестве стимулирующих клеток. Мы показали, что в такой экспериментальной системе избирательно пролиферируют Т-клетки памяти CD8, специфичные к аллоген-

ной молекуле МНС класса I и способные распознавать ее мутантные формы [14, 15]. Этот простой методический подход позволил получить клоны и Т-клеточные гибридомы клеток памяти, что, в свою очередь, открыло путь к молекулярной идентификации и клонированию их рецепторов [16]. Следующим нашим шагом стало получение животных с трансгенной экспрессией отдельных цепей TCR [17]. В силу полного или частичного (функционального) аллельного исключения β - и α -цепей TCR репертуар Т-клеток у таких животных оказывается в различной степени суженным, что дает возможность исследовать влияние индивидуальных цепей TCR на проявление широкого ряда феноменов иммунитета – таких как внутритимусная селекция Т-лимфоцитов, выживание на периферии, аллогенное распознавание, аутоиммунитет и формирование Т-клеток памяти. В этой работе мы приводим описание линии животных, экспрессирующей индивидуальную β -цепь трансгенного TCR клеток памяти, и показываем, что экспрессия трансгена β -цепи такого TCR не нарушает развитие Т-лимфоцитов, но существенно влияет на размеры пулов Т-лимфоцитов с поверхностными фенотипами наивных и ранее активированных Т-клеток.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. В работе были использованы линии мышей C57BL/6 (K^bI–A^bD^b), C57BL/10 (K^bI–A^bD^b), B10.D2(R101) (K^dI–A^dI–E^dD^b) разведения вивария Российского онкологического научного центра РАМН, гибриды F₁(CBA X C57BL/6) (питомник «Столбовая»). Мыши, трансгенные по β -цепям Т-клеточного рецептора гибридомы клеток памяти 1D1, были получены в лаборатории трансгеноза ИБГ РАН и поддерживались в лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН».

Клонирование полноразмерной кДНК β -цепи Т-клеточного рецептора гибридомы клеток памяти. Полноразмерная кДНК β -цепи Т-клеточного рецептора была клонирована в экспрессионную кассету hCD2, которая обеспечивает специфическую экспрессию гена в Т-лимфоцитах [18]. Экспрессионный кассетный вектор hCD2 любезно предоставлен проф. Dimitris Kioussis (MRC – National Institute for Medical Research, Лондон, Великобритания). Для клонирования полноразмерной кДНК β -цепи Т-клеточного рецептора гибридомы клеток памяти использовали праймеры к варибельному и константному региону β -цепи, в которые был искусственно

введен сайт рестрикции *Bam*HI (выделен жирным шрифтом):

TCRBV6S1*Bam*HI 5'-cagag**gatcc**agaaagtcctccaact-3',

CB2*Bam*HI*Bgl*II 5'-gaag**gatcc**agatctcataaaagttgtc-3'.

Продукты амплификации кДНК β -цепи Т-клеточного рецептора гибридомы клеток памяти клонировали в ТА-вектор, используя TA Cloning Kit («Invitrogen», США), после чего секвенировали в ЦКП «Геном» Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта. Результаты секвенирования анализировали с помощью программ Chromas v. 1.45, DNAssist v. 1.0 и программы BLAST в режиме on-line. Далее полноразмерную кДНК β -цепи Т-клеточного рецептора гибридомы клеток памяти, вставленную в ТА-вектор, обрабатывали рестриктазой *Bam*HI («Fermentas», Литва), очищали из агарозного геля (протокол QIAEX II Gel Extraction Kit фирмы «Qiagen», США) и клонировали в касетный вектор hCD2, линейризованный рестриктазой *Bam*HI. Перед микроинъекцией в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки из касетного вектора вырезали ген устойчивости к ампициллину рестриктазами *Sal*I и *Not*I («Fermentas», Литва). Для микроинъекций использовали раствор ДНК с концентрацией 5 нг/мкл в ТЕ-буфере для микроинъекций [19].

Создание трансгенных животных. Первичные трансгены были получены методом микроинъекций раствора ДНК в ТЕ-буфере (концентрация ДНК 5 нг/мкл) в мужской пронуклеус оплодотворенных яйцеклеток мышам F₁(СВА X С57BL/6) с последующей пересадкой выживших зигот псевдобеременным реципиентам.

Яйцеклетки получали методом индукции суперовуляции. Для этого неполовозрелым самкам гибридам F₁(СВА X С57BL/6) весом 12–13 г вводили внутривбрюшинно 8 ед. ГСЖК (гонадотропин сыворотки жеребых кобыл, «Мосагроген», Россия), через 46 ч внутривбрюшинно вводили 8 ед. ХГЧ (хорионический гонадотропин человека, Московский эндокринный завод, Россия). После такой обработки самок ссаживали с самцами-производителями F₁(СВА X С57BL/6). Факт спаривания констатировали на следующее утро по наличию копулятивной пробки.

Самок с копулятивными пробками умерщвляли путем цервикальной дислокации и извлекали яйцеводы. Яйцеклетки вымывали средой HEPES-KSOM с добавлением гиалуронидазы («Sigma», США) под бинокуляром Zeiss Stemi DV4 при увеличении 32х. Для вымывания яйцеклеток использовали стеклянные капилляры с внутренним диаметром около 100 мкм, изго-

товленные на пуллере Narishige PC-10 (Япония) и микрокузнице Narishige MF-900 (Япония). После вымывания яйцеклетки культивировали в течение двух часов (37°, 5% CO₂) в капле среды HEPES-KSOM или KSOM [20] под минеральным маслом («Sigma», США), затем помещали в микроинъекционную камеру. Микроинъекции проводили в среде HEPES-KSOM под микроскопом Zeiss Axiovert 200M при увеличении 400х–600х, используя микроманипуляторы Narishige. Для изготовления игл для микроинъекций использовали пуллер Sutter instrument Co P-97 (США), для изготовления удерживающей пипетки использовали пуллер Narishige PC-10 и микрокузницу Narishige MF-900. После окончания микроинъекций выжившие клетки переносили в каплю среды KSOM или HEPES-KSOM под минеральное масло («Sigma», США) и культивировали в течение 1 ч для выявления жизнеспособных клеток. Растворы сред готовили самостоятельно согласно протоколам, описанным нами ранее [17].

Реципиентов оплодотворенных яйцеклеток получали следующим образом: половозрелых самок F₁(СВА X С57BL/6) весом не менее 24 г ссаживали с вазэктомированными самцами той же линии. Псевдобеременных реципиентов отбирали на следующее утро по наличию копулятивных пробок.

Выжившие после микроинъекции зиготы трансплантировали в левый яйцевод псевдобеременной самки. В зависимости от количества клеток, выживших после микроинъекции, одной псевдобеременной самке пересаживали 10–20 зигот. Во время операции для обездвижения животных использовали авертин, который представляет собой раствор, содержащий 1 г 2,2,2-трибромэтанола («Sigma», США) в 1 мл 2-метил-2-бутанола («Sigma», США). Авертин разводили в 40 раз водой, полученный готовый раствор вводили внутривбрюшинно из расчета 15 мкл на 1 г веса животного.

Получение потомства и анализ наличия трансгена. В случае отсутствия естественных родов на 21-й день после пересадки микроинъекцированных яйцеклеток реципиента умерщвляли путем цервикальной дислокации и проводили кесарево сечение, после чего выживших детенышей помещали к заранее подготовленной кормилице. Через 14–21 день после рождения у мышат, развившихся из микроинъекцированных яйцеклеток, проводили забор тканей (кончик хвоста размером 2–3 мм), выделяли ДНК и анализировали наличие трансгена методом ПЦР.

Типирование мышей методом ПЦР. ДНК для ПЦР выделяли по стандартному протоколу («Molecular Cloning», США). Амплификацию фраг-

ментов ДНК проводили с помощью Taq-полимеразы («Evrogen», Россия) в буфере (с 2,5 мМ MgCl₂), прилагаемом фирмой-производителем, в присутствии 2 мМ dNTP и 10 пМ каждого праймера в следующих режимах: денатурация 94° – 3 мин; далее следовало 4 цикла: 94° – 20 с, 62° – 30 с; 72° – 35 с; 8 циклов: 94° – 20 с, 60° – 30 с, 72° – 35 с; затем 25 циклов: 94° – 20 с, 58° – 30 с, 72° – 35 с и, наконец, последний синтез 72° – 10 мин. Праймеры, используемые для амплификации трансгенной β-цепи Т-клеточного рецептора, приведены выше. Для амплификации гена CD4 использовали праймеры:

CD4w-S 5'-gaggttcgccttcgcagttgat-3',

CD4w-AS 5'-tggacatggagagaactttgga-3'.

После завершения ПЦР 10 мкл реакционной смеси наносили на 1,5%-ный агарозный гель, содержащий бромистый этидий, и разделяли электрофорезом в ТАЕ-буфере (по протоколу «Molecular Cloning», США). Гели фотографировали и анализировали, используя трансиллюминатор, оборудованный CD-камерой.

Выделение мононуклеаров из периферической крови. Забор крови осуществляли из ретроорбитального венозного синуса пастеровской пипеткой со сломанным кончиком. На каждые 100 мкл крови добавляли 30 мкл раствора гепарина (концентрация 5000 ед/мл), затем лизировали эритроциты лизирующим буфером (0,826 г NH₄Cl; 0,1 г NaHCO₃; 0,0037 г Na₂EDTA на 100 мл H₂O) и 2 раза отмывали центрифугированием в PBS (200 г, 5 мин).

Оценка количества лимфоцитов, экспрессирующих трансген. Для оценки количества периферических лимфоцитов, несущих трансгенную β-цепь Т-клеточного рецептора клеток памяти, из периферической крови трансгенных животных выделяли фракцию мононуклеаров способом, описанным выше, окрашивали моноклональными антителами к CD3 и Vβ6, конъюгированными с флуорохромами, затем определяли процент клеток CD3⁺, несущих трансгенный TCR, используя проточный цитофлуориметр BD FACSCanto II.

Приготовление клеточных суспензий. Лимфоциты выделяли из селезенки и тимуса мышей в гомогенизаторе Поттера с коническим пестиком осторожным выдавливанием из стромы органа. В суспензии клеток селезенки лизировали эритроциты, добавляя к осадку лизирующий буфер. Затем спленоциты и тимоциты осаждали центрифугированием (200 г, 5 мин) и ресуспендировали в PBS. Жизнеспособные клетки подсчитывали в смеси трипанового синего и эозина в камере Горяева.

Антитела. Для анализа клеток на проточном цитофлуориметре (BD FACSCanto II, «Becton Dickinson», США) использовали следующие моноклональные антитела: анти-CD8α (клон 53-6.7), конъюгированные с флуорохромом FITC («BD Pharmingen», США); анти-mouse TCR Vβ6 (клон RR4-7), конъюгированные с флуорохромом PE («BD Pharmingen», США); анти-CD62L (клон MEL-14), конъюгированные с флуорохромом APC/Cy7 («BioLegend», США); анти-CD44 (клон IM7), конъюгированные с флуорохромом APC («BioLegend», США); анти-CD3 (клон 17A2), конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor[®]647 («eBioscience», США); анти-CD3 (клон 17A2), конъюгированные с флуорохромом eFluor[®]450 («eBioscience», США); анти-CD4 (клон L3T4), конъюгированные с флуорохромом APC («BD Pharmingen», США). Для окрашивания мертвых клеток использовали пропидия йодид (PI) 7,5 · 10⁻⁵ М («Sigma», США).

Окрашивание антителами и анализ на проточном цитофлуориметре. Окрашивание антителами проводили при 4° в течение 35 мин. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II («Becton Dickinson», США) с использованием программы BD FACSDiva 6.0. Погибшие клетки исключали из анализа по окрашиванию PI и по показателям рассеивания. Анализировали не менее 100 тыс. событий для характеристики периферических популяций Т-лимфоцитов. Для анализа результатов использовали программу Flow Jo 7.6.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение первичных трансгенов. Первичные трансгены 1D1b были получены методом микроинъекции раствора ДНК в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки. Наличие трансгена в геноме мышей, рожденных после микроинъекций генетической конструкции 1D1b, определяли методом ПЦР. На рис. 1, а представлены результаты ПЦР-анализа. Были получены два первичных трансгена (№ 1 и 2 соответственно). Наличие трансгена в геноме не гарантирует его эффективной экспрессии [21]. Поэтому дополнительно был проведен цитофлуориметрический анализ для определения количества Т-лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих трансген на своей поверхности (рис. 1, б). V-сегмент β-цепи Т-клеточного рецептора гибридомы клеток памяти 1D1 относится к семейству Vβ6, что позволяет использовать моноклональные антитела к Vβ6 для обнаружения Т-клеток, экспрессирующих трансген. У мышей дикого типа доля Т-клеток, несущих определен-

ный V β -сегмент, обычно не превышает десяти процентов, тогда как у трансгенных животных значительно увеличивается. У первичного трансгена № 1 около 70% Т-лимфоцитов периферической крови несли на своей поверхности трансгенную β -цепь TCR, однако у первичного трансгена № 2 только 26% Т-клеток периферической крови экспрессировали трансген (рис. 1, б, нижняя панель). Общее количество Т-лимфоцитов в периферической крови у первичных трансгенов не было снижено по сравнению с контролем (рис. 1, б, верхняя панель), что косвенно указывает на отсутствие нарушений в их онтогенезе.

Получение трансгенной линии на генетической основе линии B10.D2(R101). Т-клеточный рецептор, составной частью которого является исследуемая β -цепь, изначально сформировался и прошел внутритимусную селекцию в окружении молекул МНС рекомбинантного гаплотипа H-2^{g1} мышей B10.D2(R101) (K^dI^dD^b). По ряду технических причин первичные трансгены были получены на генетической основе гибридов F₁ линии (CBA X C57BL/6), потомство которых име-

ет смешанную генетическую основу и поэтому непригодно для проведения иммунологических экспериментов. Для перевода трансгена на генетическую основу линии B10.D2(R101) был проведен ряд возвратных скрещиваний с мышами данной линии. Оба первичных трансгена стали основателями линий: сублиния 1D1b, ведущая начало от первичного трансгена № 1, получила название 1D1bFM, сублиния, основателем которой стал первичный трансген № 2 – 1D1bFF. На данный момент детально охарактеризован поверхностный фенотип тимоцитов и зрелых Т-лимфоцитов мышей сублинии 1D1bFM. До поколения F₂ количество CD3⁺Vb6⁺ клеток в периферической крови трансгенных животных широко варьировало (данные не представлены), однако уже в поколении F₂ экспрессия трансгена стала стабильной и далее не изменялась в ряду поколений (рис. 2, б). Животных, несущих трансген в геноме и не экспрессирующих его, мы не обнаружили (данные не представлены). Экспрессия трансгена не приводила к изменению общего количества CD3⁺-клеток в периферической крови (рис. 2, а). Изменений клеточ-

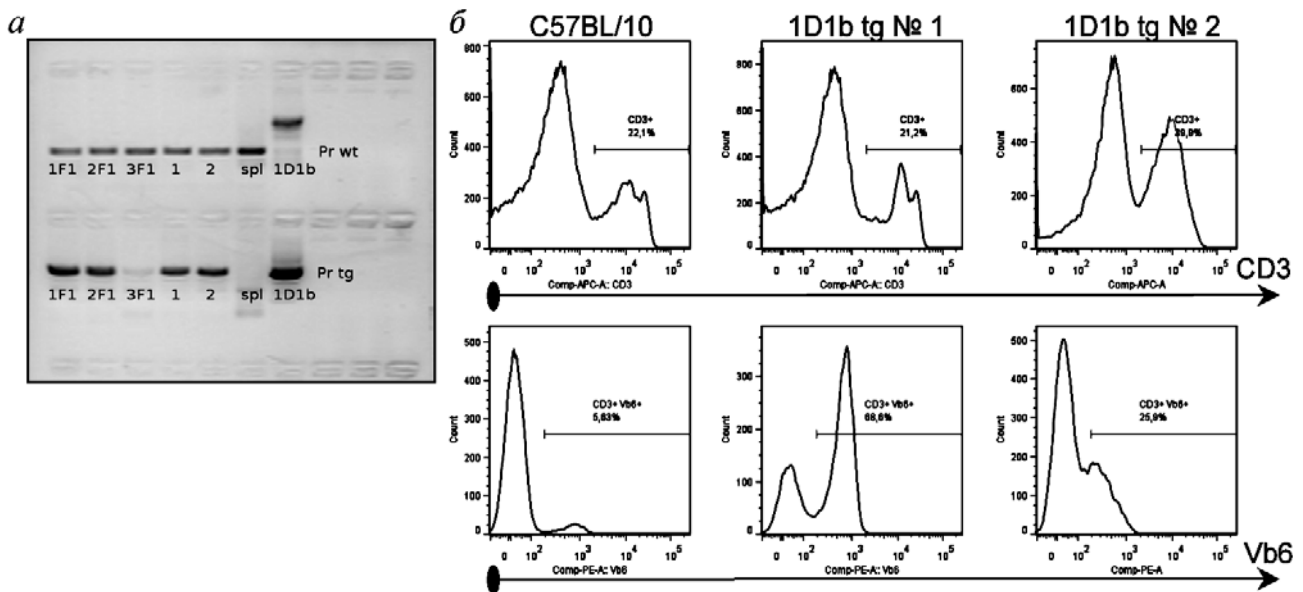


Рис. 1. а – Анализ ПЦР-продукта ДНК мышей, рожденных после микроинъекции полноразмерной кДНК α -цепи Т-клеточного рецептора гибридомы 1D1, клонированной в экспрессионный вектор hCD2, и мышей первого поколения F₁ трансгенной линии 1D1bFM. Pr wt – праймеры к гену CD4; Pr tg – праймеры к гену β -цепи Т-клеточного рецептора гибридомы 1D1; 1F1, 2F1, 3F1 – ДНК-матрица мышей поколения F₁ трансгенной линии 1D1bFM № 1, 2 и 3 соответственно; 1, 2 – ДНК-матрица первичных трансгенов 1D1b № 1 и 2; spl – ДНК-матрица мыши линии C57BL/6 (негативный контроль); 1D1b – ДНК-матрица экспрессионного вектора hCD2, содержащего полноразмерную кДНК β -цепи Т-клеточного рецептора гибридомы 1D1 (позитивный контроль). б – Цитофлуориметрический анализ количества CD3⁺-лимфоцитов (верхняя панель) и экспрессии β -цепи Т-клеточного рецептора гибридомы клеток памяти 1D1 (нижняя панель) в периферической крови первичных трансгенов 1D1b. C57BL/10 – клетки периферической крови мыши линии C57BL/10; 1D1b tg № 1 – клетки периферической крови первичного трансгена 1D1b № 1; 1D1b tg № 2 – клетки периферической крови первичного трансгена 1D1b № 2

ности лимфоидных органов у трансгенных животных по сравнению с контролем мы также не обнаружили. Продолжительность жизни не отличается у трансгенных животных и животных дикого типа (данные не представлены).

Таким образом, мы получили линию мышей, трансгенных по β -цепи Т-клеточного рецептора клеток памяти, на генетической основе линии B10.D2(R101). Линия характеризуется стабильной тканеспецифичной экспрессией трансгена — антителами к $\text{V}\beta 6$ окрашиваются только $\text{CD}3^+$ -Т-лимфоциты.

Поверхностный фенотип тимоцитов мышей трансгенной линии 1D1bFM. Известно, что экспрессия трансгенных α - и β -цепей TCR может влиять на развитие Т-лимфоцитов внутри тимуса. Отчасти это связано с тем, что экспрессия трансгенов TCR подавляет реаранжировку эндогенных цепей [22, 23]. С другой стороны, экспрессия трансгенов TCR может приводить к изменению характера взаимодействия Т-лимфоцитов с молекулами МНС внутри тимуса и, таким образом, влиять на процессы их позитивной и негативной селекции [24]. Мы провели цитофлуориметрический анализ субпопуляций тимоцитов мышей трансгенной линии 1D1bFM и мышей B10.D2(R101) дикого типа. Из рис. 3, а видно, что в тимусе трансгенных мышей немного увеличена доля двойных негативных $\text{CD}4^-\text{CD}8^-$ (DN) тимоцитов, однако соотношение других субпопуляций тимоцитов (двойных позитивных $\text{CD}4^+\text{CD}8^+$ (DP) и однопозитивных $\text{CD}4^+\text{CD}8^-$ и $\text{CD}4^-\text{CD}8^+$ (SP)) остается практически неизменным. Увеличение доли DN тимоцитов, возможно, связано с тем, что наличие трансгенной β -цепи препятствует гибели клеток, которые в норме гибнут «от забвения» из-за непродуктивных реаранжировок эндогенных β -цепей и невозможности сформировать функциональный пре-TCR, необходимый для дальнейшей дифференцировки Т-клеток.

Появление трансгенной β -цепи на поверхности тимоцитов явно коррелирует со стадиями их созревания. У созданных нами трансгенных животных β -цепь TCR экспрессируется под промотором hCD2, т.е. ее экспрессия начинается на стадии DN3, что совпадает по времени с началом процессов β -селекции эндогенных цепей TCR. Возможно, именно поэтому около 20% Т-клеток успевают реаранжировать собственную эндогенную β -цепь и не экспрессируют трансген.

Среди тимоцитов DN лишь незначительное количество клеток окрашивается антителами к $\text{V}\beta 6$ (рис. 3, д). На стадии DP доля клеток, несущих трансгенную β -цепь, значительно возрастает (рис. 3, з). Это связано с тем, что на стадии DP

происходит реаранжировка α -цепи и ее выход на поверхность клетки в составе зрелого TCR в комплексе с белками CD3-комплекса [25]. Большая часть однопозитивных $\text{CD}4^+$ - и $\text{CD}8^+$ -timoцитов экспрессирует трансген β -цепи и несет на поверхности его продукт. Соотношение субпопуляций тимоцитов $\text{CD}4^+$ и $\text{CD}8^+$, экспрессирующих трансген, не нарушено, что указывает на отсутствие предпочтения трансгенных клеток в выборе линии дифференцировки ($\text{CD}4^+$ или $\text{CD}8^+$).

Появление молекулы CD3 на поверхности тимоцитов трансгенных животных коррелирует

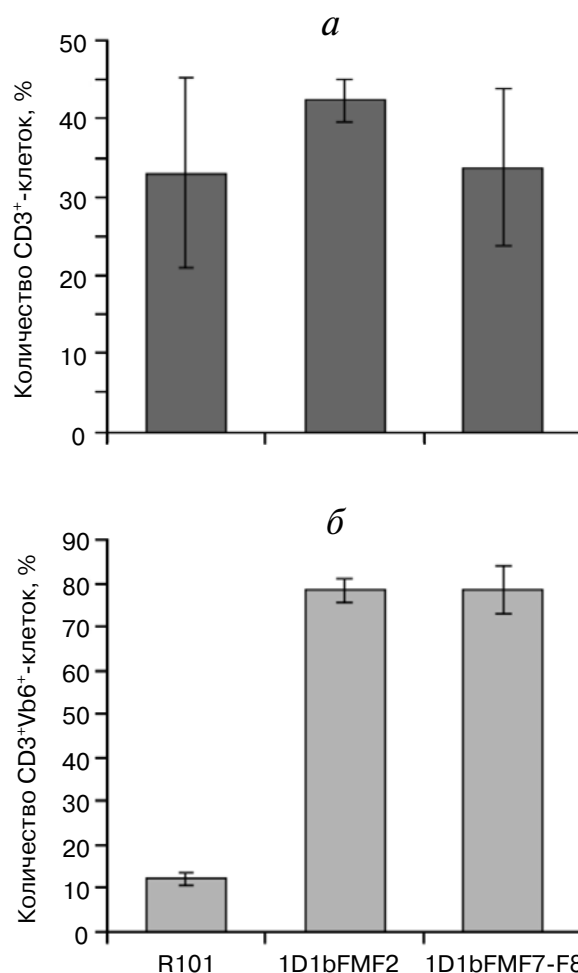


Рис. 2. Относительное количество $\text{CD}3^+$ -лимфоцитов (а) и экспрессия β -цепи Т-клеточного рецептора гибридомы клеток памяти 1D1 (б) в периферической крови трансгенов 1D1b FM поколений F₂, F₇ и F₈. **R101** — клетки периферической крови мыши линии B10.D2(R101) (n = 7); **1D1b FM F2** — клетки периферической крови трансгена 1D1FM F₂ (n = 6); **1D1b FM F7-F8** — клетки периферической крови трансгенных мышей 1D1b FM F₇ и F₈ (n = 25)

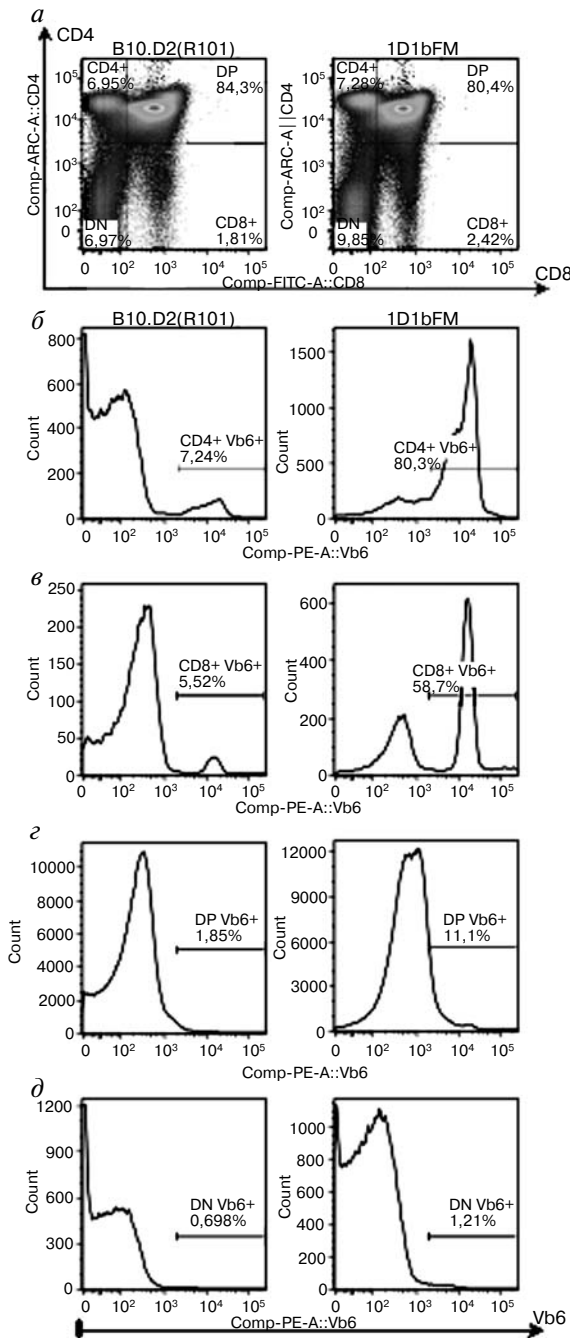


Рис. 3. *a* – Цитофлуориметрический анализ экспрессии маркеров CD4 и CD8 клетками тимуса мышей трансгенной линии 1D1bFM на генетической основе линии B10.D2(R101). *б–д* – Цитофлуориметрический анализ экспрессии трансгенной β-цепи T-клеточного рецептора гибридомы 1D1 тимоцитами мышей 1D1bFM на генетической основе линии B10.D2(R101). Представлен анализ живых одиночных CD4⁺-timoцитов (CD4⁺, *б*), CD8⁺-timoцитов (CD8⁺, *в*), двойных позитивных CD4⁺CD8⁺ (DP, *з*) и двойных негативных CD4⁻CD8⁻ (DN, *д*) тимоцитов. **B10.D2(R101)** – тимоциты мыши линии B10.D2(R101); **1D1bFM** – тимоциты мыши трансгенной линии 1D1bFM поколения F₇; проанализировано шесть контрольных и шесть трансгенных животных; представлены данные одного из трех репрезентативных экспериментов

со стадиями их созревания и тесно связано с экспрессией трансгена (данные не представлены). На стадии DN доля трансгенных тимоцитов CD3⁺ значительно снижена по сравнению с животными дикого типа, что может указывать на подавление реаранжировки γ-цепей вследствие экспрессии функционального трансгена β-цепи (рис. 4).

Поверхностный фенотип периферических CD3⁺-лимфоцитов мышей трансгенной линии 1D1bFM. После прохождения тимусной селекции трансгенные CD4⁺- и CD8⁺-T-клетки выходят на периферию. В нашем исследовании было важно оценить, сохраняют ли они способность рециркулировать, поддерживается ли нормальное соотношение между субпопуляциями T-клеток CD4⁺ и CD8⁺ в периферических лимфоидных органах и какая доля клеток этих субпопуляций экспрессирует трансген. В селезенке трансгенных животных, как и в тимусе, соотношение субпопуляций T-лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺ не изменено по сравнению с животными дикого типа (рис. 5, *a*). Трансген экспрессируют обе субпопуляции T-клеток селезенки (рис. 5, *б, в*), однако доля Vβ6⁺ лимфоцитов несколько выше в субпопуляции CD8⁺ (рис. 5, *в*) по сравнению с субпопуляцией CD4⁺ (рис. 5, *б*). Таким образом, T-клетки, экспрессирующие трансген β-цепи TCR 1D1, успешно проходят тимусную селекцию, заселяют периферические лимфоидные органы и рециркулируют на периферии.

В отличие от животных дикого типа, 70–80% T-лимфоцитов полученных нами животных состоят из клеток, TCR которых содержит трансгенную β-цепь, тогда как 20–30% несут T-клеточные рецепторы, образовавшиеся в процессе нормальных реаранжировок генов α- и β-цепей. Таким образом, мы получили возможность исследовать влияние экспрессии трансгенной β-цепи на формирование T-лимфоцитов с поверхностными фенотипами наивных и активированных T-клеток, а также оценить их баланс среди T-лимфоцитов, экспрессирующих эндогенные и трансгенную цепи TCR.

Мы проанализировали экспрессию активационных маркеров CD62L и CD44 в популяциях CD4⁺- и CD8⁺-T-лимфоцитов селезенки (рис. 6). Количество лимфоцитов с фенотипом наивных клеток (CD44⁻CD62L⁺) у трансгенных животных достоверно увеличивается по сравнению с контролем как среди CD8⁺-T-лимфоцитов (рис. 6, верхняя панель), так и CD4⁺-T-лимфоцитов (рис. 6, нижняя панель). Напротив, количество клеток с активационными фенотипами эффекторов (CD44⁺CD62L⁻) и клеток памяти (CD44⁺CD62L⁺) у трансгенных животных оказалось сниженным по сравнению с контролем.

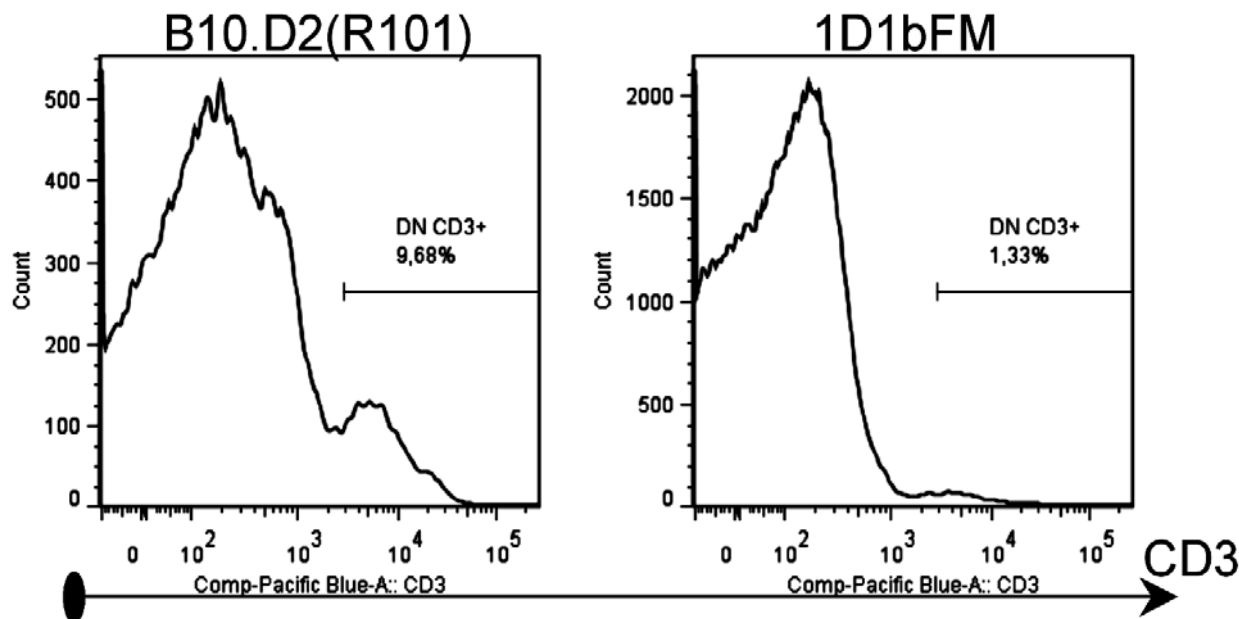


Рис. 4. Цитофлуориметрический анализ экспрессии маркера CD3 двойными негативными ($CD4^-CD8^-$, DN) тимоидами мышей трансгенной линии 1D1bFM на генетической основе линии B10.D2(R101). Представлен анализ живых одиночных тимоцитов. **B10.D2(R101)** – тимоциты мыши линии B10.D2(R101); **1D1bFM** – тимоциты мыши трансгенной линии 1D1bFM поколения F₇; проанализировано четверо контрольных и четверо трансгенных животных; представлены данные одного из трех репрезентативных экспериментов

При этом Т-лимфоциты, экспрессирующие трансгенную β -цепь, имеют фенотип наивных Т-клеток $CD44^-$, а эндогенные β -цепи – фенотип активированных $CD44^+$ (рис. 7). Таким образом, баланс Т-лимфоцитов с фенотипами наивных и активированных Т-клеток в субпопуляциях $V\beta6^-$ и $V\beta6^+$ у мышей трансгенной линии существенно нарушен по сравнению с животными дикого типа.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В этой работе мы изучали последствия экспрессии трансгена β -цепи TCR Т-гибридомы клеток памяти, клонированной нами ранее [26]. При исследовании тимуса трансгенных мышей мы не обнаружили нарушений в развитии Т-клеток, вызванных экспрессией трансгена. После прохождения внутритимусной селекции $CD4^+$ - и $CD8^+$ -лимфоциты, экспрессирующие трансген, выходят на периферию, успешно там рециркулируют, и их нормальное соотношение не нарушается.

Одной из основных задач нашего исследования была оценка взаимосвязи структуры Т-клеточного рецептора с фенотипическими особен-

ностями Т-лимфоцита, в частности, важно было ответить на вопрос, влияет ли экспрессия трансгенной β -цепи TCR клеток памяти на поверхностный фенотип Т-клеток. При цитофлуориметрическом анализе субпопуляции наивных Т-клеток, эффекторов и Т-клеток памяти мыши обычно идентифицируют, основываясь на экспрессии маркеров $CD44$ и $CD62L$. При этом фенотип $CD44^-CD62L^+$ характеризует наивные Т-клетки, $CD44^+CD62L^+$ – клетки памяти (central memory cells) и $CD44^+CD62L^-$ – эффекторы (effector memory cells) [27]. Цитофлуориметрический анализ экспрессии этих маркеров Т-клетками селезенки созданных нами мышей трансгенной линии показал выраженное снижение доли Т-клеток с фенотипом активированных клеток и увеличение доли клеток с фенотипом наивных Т-лимфоцитов. Таким образом, мы установили, что баланс субпопуляций наивных и активированных Т-клеток может меняться под воздействием экспрессии трансгена β -цепи TCR. Самым интересным открытием этой работы стало то, что Т-лимфоциты трансгенных животных, экспрессирующие эндогенные цепи TCR, приобретают фенотип активированных Т-клеток, что обычно имеет место в условиях лимфопении, вызванной облучением или воздействием цитостатиков.

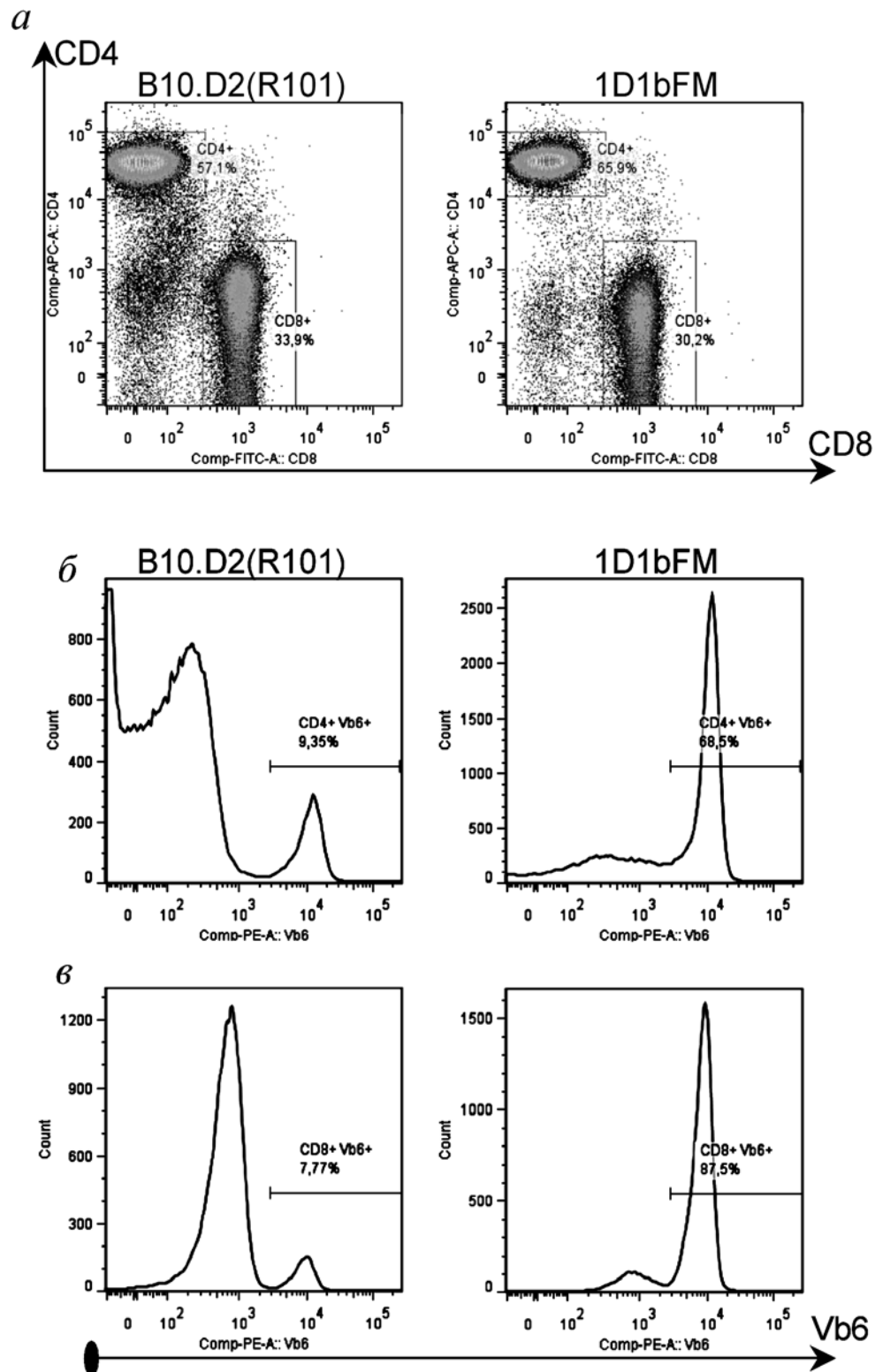


Рис. 5. *a* – Цитофлуориметрический анализ экспрессии молекул CD4 и CD8 одиночными живыми клетками селезенки мышей трансгенной линии 1D1bFM на генетической основе линии B10.D2(R101). *б, в* – Цитофлуориметрический анализ экспрессии трансгенной β -цепи Т-клеточного рецептора гибридомы клеток памяти 1D1 CD4⁺ (*б*) и CD8⁺ (*в*) спленоцитами мышей трансгенной линии 1D1bFM на генетической основе линии B10.D2(R101). **B10.D2(R101)** – спленоциты линии B10.D2(R101); **1D1bFM** – спленоциты мыши трансгенной линии 1D1bFM поколения F₇; проанализировано шесть контрольных и восемь трансгенных животных; представлены данные одного из трех репрезентативных экспериментов

В работах, опубликованных ранее, как правило, исследуются эффекты экспрессии трансгенных TCR, состоящих из α - и β -цепей, обе из которых являются трансгенными, что приводит к существенной «поломке» репертуара и нефизиологично из-за высокого содержания в организме Т-лимфоцитов одной и той же специфичности. Это создает существенные проблемы для

их адекватной селекции в тимусе и дальнейшего выживания на периферии. В этом плане созданная нами модель более удачна, поскольку допускает формирование разнообразного репертуара Т-клеточных рецепторов в результате реаранжировки эндогенных α -цепей. В литературе есть лишь единичные сообщения о влиянии трансгенной экспрессии индивидуальных цепей TCR

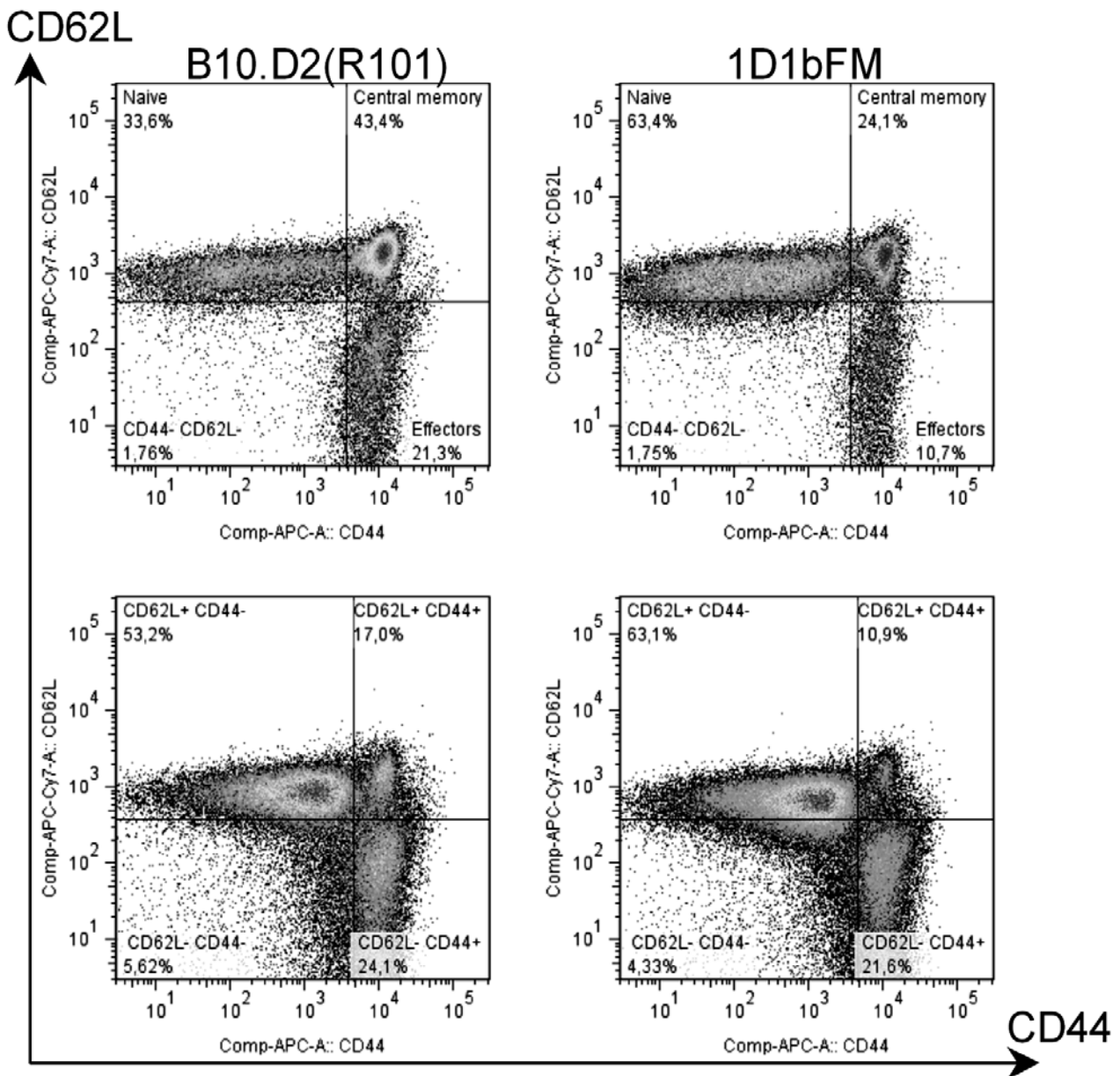


Рис. 6. Цитофлуориметрический анализ коэкспрессии молекул CD62L и CD44 спленоцитами мышей трансгенной линии 1D1bFM на генетической основе линии B10.D2(R101). Верхняя панель – цитофлуориметрический анализ живых одиночных CD8⁺-спленоцитов; нижняя панель – цитофлуориметрический анализ живых одиночных CD4⁺-спленоцитов. **B10.D2(R101)** – спленоциты линии B10.D2(R101); **1D1bFM** – спленоциты мыши трансгенной линии 1D1bFM поколения F₇. Относительное количество CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов с поверхностным фенотипом CD44⁻CD62L⁺ и CD44⁺CD62L⁺ у трансгенных мышей достоверно отличается от мышей дикого типа ($P < 0,05$), проанализировано шесть контрольных животных и восемь трансгенных животных; данные получены в трех независимых экспериментах

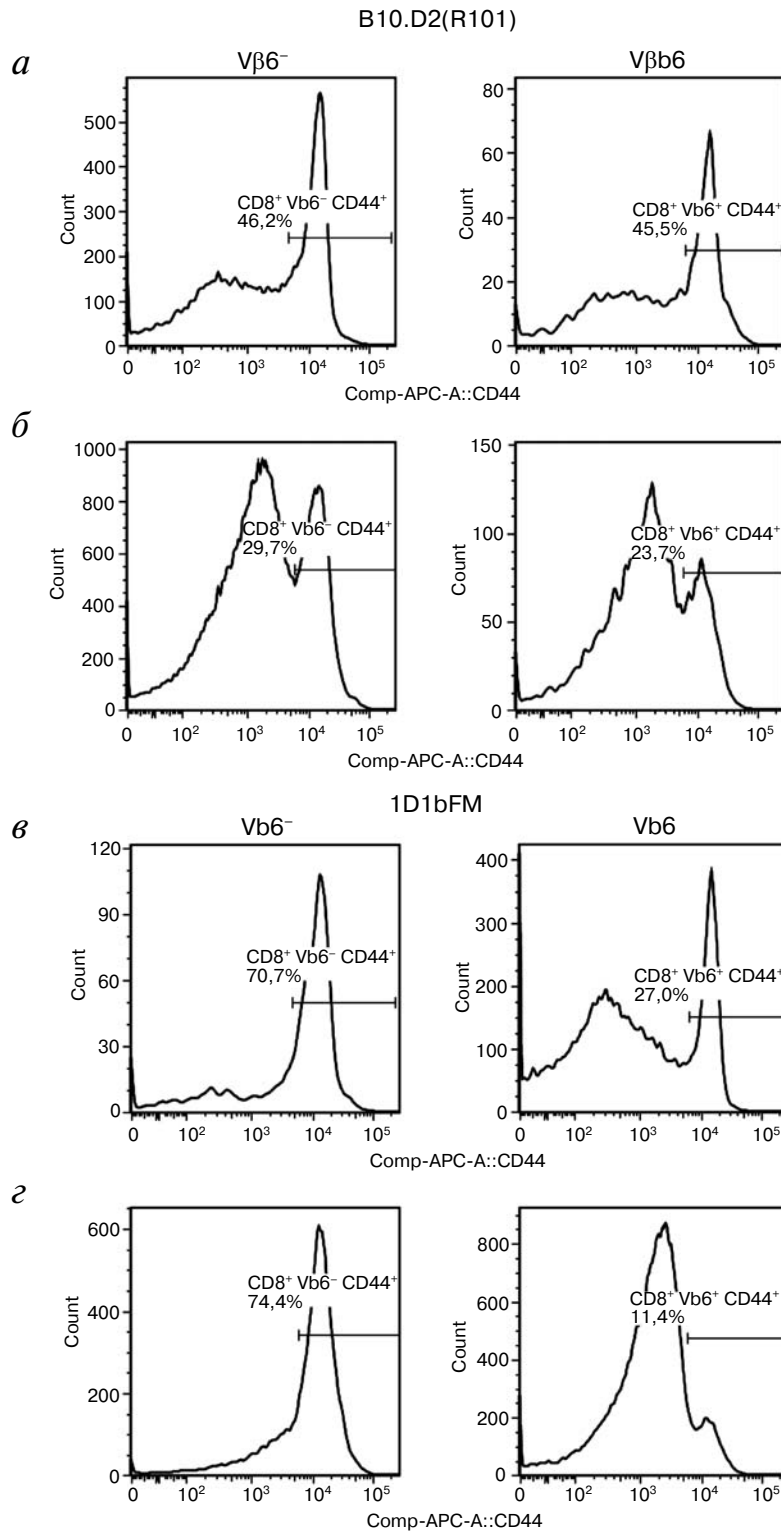


Рис. 7. Процентное содержание Т-лимфоцитов с активированным фенотипом (CD44⁺) в субпопуляциях CD8⁺V β 6⁻, CD8⁺V β 6⁺, CD4⁺V β 6⁻ и CD4⁺V β 6⁺ спленоцитов мышей линии 1D1bFM (1D1bFM, *в*, *г*) на генетической основе линии B10.D2(R101) по сравнению с линией B10.D2(R101) (B10.D2(R101), *а*, *б*). V β 6⁻ – Процентное содержание CD44⁺-лимфоцитов в субпопуляции CD8⁺V β 6⁻ и CD4⁺V β 6⁻; V β 6⁺ – процентное содержание CD44⁺-лимфоцитов в субпопуляции CD8⁺V β 6⁺ и CD4⁺V β 6⁺; *а*, *в* – процентное содержание CD44⁺-лимфоцитов в субпопуляции CD8⁺; *б*, *г* – процентное содержание CD44⁺-лимфоцитов в субпопуляции CD4⁺. Проанализировано шесть контрольных животных и восемь трансгенных животных; данные получены в трех независимых экспериментах

на функциональные свойства Т-клеточного репертуара. Показано, что экспрессия трансгенной β -цепи TCR DO-11.10 (V β 8.2) снижает ответы Т-лимфоцитов на ряд различных антигенов, включая аллогенные молекулы МНС, а также тяжесть проявления аутоиммунного заболевания, развивающегося у мышей линии MRL-lpr. Вместе с тем, у трансгенных мышей MRL-lpr наблюдается накопление активированных Т-клеток с фенотипом CD4⁺CD44⁺V β 8.2⁻, которые являются главными виновниками прогрессирования заболевания у трансгенных животных [28, 29].

Принципиальным отличием нашей работы является то, что похожие Т-лимфоциты с фенотипом активированных Т-клеток, несущие эндогенные цепи TCR, мы видим у интактных животных в отсутствие антигенной стимуляции и каких-либо проявлений аутоиммунных заболеваний.

В нашем исследовании неожиданным оказалось то, что клетки, экспрессирующие трансген β -цепи TCR аллоспецифичных клеток памяти, в

противоположность нашим ожиданиям, не приобретают поверхностный фенотип CD44⁺, а утрачивают его, тогда как Т-клетки, экспрессирующие эндогенные β -цепи, его приобретают, аналогично Т-лимфоцитам, находящимся в условиях лимфопении. Механизмы, лежащие в основе этого феномена, пока неясны, но могут быть связаны с конкуренцией Т-лимфоцитов за эндогенные комплексы МНС–пептид в лимфоидной ткани. В любом случае, очевидно, что полученные нами результаты свидетельствуют о наличии тесной взаимосвязи между особенностями структуры Т-клеточных рецепторов и поверхностным активационным фенотипом отдельных Т-клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 08-04-00563-а и 11-04-00700-а), Минобрнауки России (государственный контракт № 14.518.11.7040) и ЗАО Центр внедрения «Протек».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vazquez-Cintron, E.J., Monu, N.R., Burns, J.C., Blum, R., Chen, G., Lopez, P., Ma, J., Radoja, S., and Frey, A.B. (2012) *PLoS One*, **7**, e36101.
- Ophir, E., Eidelstein, Y., Afik, R., Bachar-Lustig, E., and Reisner, Y. (2010) *Blood*, **115**, 2095–2104.
- Akue, A.D., Lee, J.-Y., and Jameson, S.C. (2012) *J. Immunol.*, **188**, 2516–2523.
- Haluszczyk, C., Akue, A.D., Hamilton, S.E., Johnson, L.D.S., Pujanauski, L., Teodorovic, L., Jameson, S.C., and Kedl, R.M. (2009) *J. Exp. Med.*, **206**, 435–448.
- Goldrath, A.W., Bogatzki, L.Y., and Bevan, M.J. (2000) *J. Exp. Med.*, **192**, 557–564.
- Cho, B.K., Rao, V.P., Ge, Q., Eisen, H.N., and Chen, J. (2000) *J. Exp. Med.*, **192**, 549–556.
- Moxham, V.F., Karegli, J., Phillips, R.E., Brown, K.L., Tapmeier, T.T., Hangartner, R., Sacks, S.H., and Wong, W. (2008) *J. Immunol.*, **180**, 3910–3918.
- Voehringer, D., Liang, H.E., and Locksley, R.M. (2008) *J. Immunol.*, **180**, 4742–4753.
- Kirberg, J., Berns, A., and von Boehmer, H. (1997) *J. Exp. Med.*, **186**, 1269–1275.
- Savage, P.A., Boniface, J.J., and Davis, M.M. (1999) *Immunity*, **10**, 485–492.
- Milner, J.D., Fasth, A., and Etzioni, A. (2008) *J. Clin. Immunol.*, **Suppl 1**, 29–33. doi: 10.1007/s10875-007-9159-y.
- Le Campion, A., Gagnerault, M.C., Auffray, C., Becourt, C., Poitrasson-Riviere, M., Lallemand, E., Bienvenu, B., Martin, V., Lepault, F., and Lucas, B. (2009) *Blood*, **114**, 1784–1793.
- Казанский Д.Б., Петришев В.Н., Штиль А.А., Чернышева А.Д., Сернова Н.В., Абронина И.Ф., Побезинский Л.А., Агафонова Е.Л. (1999) *Биоорг. химия.*, **25**, 117–128.
- Казанский Д.Б., Чернышева А.Д., Сернова Н.В., Петришев В.Н., Побезинский Л.А., Агафонова Е.Л. (1998) *Мол. биол.*, **32**, 692–702.
- Гриненко Т.С., Побезинская Е.Л., Побезинский Л.А., Батурина И.А., Звездова Е.С., Казанский Д.Б. (2005) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **140**, 556–561.
- Побезинская Е.Л., Побезинский Л.А., Силаева Ю.Ю., Анфалова Т.В., Хромых Л.М., Терещенко Т.С., Звездова Е.С., Казанский Д.Б. (2004) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **137**, 563–568.
- Звездова Е.С., Силаева Ю.Ю., Вагида М.С., Марюхнич Е.В., Дейкин А.В., Ермолкевич Т.Г., Кадулин С.Г., Садчикова Е.Р., Гольдман И.Л., Казанский Д.Б. (2010) *Мол. биол.*, **44**, 311–322.
- Zhumabekov, T., Corbella, P., Tolaini, M., and Kioussis, D. (1995) *J. Immunol. Methods*, **185**, 133–140.
- Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Yagle, M.K., and Palmiter, R.D. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4438–4442.
- Erbach, G.T., Lawitts, J.A., Papaioannou, V.E., and Biggers, J.D. (1994) *Biol. Reprod.*, **50**, 1027–1033.
- Auerbach, A.B. (2004) *Acta Biochim. Pol.*, **51**, 9–31.
- Gui, M., Li, J., Wen, L.J., Hardy, R.R., and Hayakawa, K. (2001) *J. Immunol.*, **167**, 6239–6246.
- Biro, J., Wurch, A., Potocnik, A.J., Falk, I., Mossmann, H., and Eichmann, K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3882–3887.
- Egawa, T., Kreslavsky, T., Littman, D.R., and von Boehmer, H. (2008) *PLoS One*, **3**, e1512.
- Dave, V.P., Cao, Z., Browne, C., Alarcon, B., Fernandez-Miguel, G., Lafaille, J., de la Hera, A., Tonegawa, S., and Kappes, D.J. (1997) *EMBO J.*, **16**, 1360–1370.
- Звездова Е.С., Гриненко Т.С., Побезинская Е.Л., Побезинский Л.А., Казанский Д.Б. (2008) *Мол. биол.*, **42**, 662–672.
- Laouar, A. (2008) *PLoS ONE*, **3**, e4089.
- Listman, J.A., Rimm, I.J., Wang, Y., Geller, M.C., Tang, J.C., Ho, S., Finn, P.W., and Perkins, D.L. (1996) *Cell Immunol.*, **167**, 44–55.
- Perkins, D.L., Listman, J.A., Marshak-Rothstein, A., Kozlow, W., Kelley, V.R., Finn, P.W., and Rimm, I.J. (1996) *J. Immunol.*, **156**, 4961–4968.

**CONTRACTION OF THE POOL OF T LYMPHOCYTES
WITH SURFACE PHENOTYPES OF EFFECTOR
AND CENTRAL MEMORY CELLS UNDER INFLUENCE
OF TCR TRANSGENIC β -CHAIN EXPRESSION**

**Yu. Yu. Silaeva¹, A. A. Kalinina¹, M. S. Vagida¹, L. M. Khromykh¹,
A. V. Deikin², T. G. Ermolkevich², E. R. Sadchikova²,
I. L. Goldman², D. B. Kazansky^{1*}**

¹ *Federal State Budgetary Institution N. N. Blokhin Cancer Research Center,
Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoye sh. 24, Moscow 115478, Russia;
E-mail: kazansky1@yandex.ru*

² *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 34/5, Moscow 119334, Russia*

Received January 14, 2013

Revision received February 25, 2013

Peripheral T lymphocytes may be subdivided into naive and antigen-experienced T cells that in turn are represented by effector and central memory cells. Obviously, they are identified by distinction in profiles of expression of activation markers, such as CD44 and CD62L in mice. These markers determine different traffic of T lymphocytes in the organism, but hardly reproduce real antigenic experience of T lymphocyte. Mechanisms maintaining homeostasis of T lymphocytes with different activation phenotypes remain largely unknown. To investigate impact of T cell receptor (TCR) transgenic chains in formation of T lymphocytes, their peripheral survival and activation surface phenotypes, we have generated transgenic mouse strain expressing transgenic β -chain of TCR 1D1 (belonging to V β 6 family) on genetical background B10.D2(R101). Intrathymic development of T cells in these transgenic mice is not impaired. The repertoire of peripheral T lymphocytes in these mice contains 70–80% of T cells expressing transgenic β -chain and 20–30% of T cells expressing endogenous β -chains. The ratios of peripheral CD4⁺CD8⁻ and CD4⁻CD8⁺ T lymphocytes stayed unchanged in transgenic animals but the percent of T lymphocytes with naive phenotype CD44⁻CD62L⁺ was significantly increased, whereas the levels of effector memory CD44⁺CD62L⁻ and central memory CD44⁺CD62L⁺ T lymphocytes were markedly decreased in both subpopulations. Against, T lymphocytes expressing endogenous β -chains possessed surface phenotype of activated T cells CD44⁺. Thereby, we have shown for the first time that abundance of T lymphocytes possessing different activation phenotypes depends on the structure of T cell receptors.

Key words: T cell receptor, transgenic animals, lymphocyte, effector, memory cell