

ЦЕПЕЦЕНТРИЧНОСТЬ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ У ПЕРВИЧНО АКТИВИРОВАННЫХ ЭФФЕКТОРОВ И РЕСТИМУЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК ПАМЯТИ

А. А. Калинина¹, М. В. Кубекина², Н. А. Персиянцева¹, А. В. Брутер^{1,2}, Л. М. Хромых¹, Д. Б. Казанский¹✉

¹ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина, Москва, Россия

² Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена, Москва, Россия

T-клетки, эффекторы адаптивного иммунитета, оснащены антигенраспознающим T-клеточным рецептором (ТКР), который представляет собой $\alpha\beta$ -гетеродимер. Для ряда ТКР было показано функциональное доминирование одной цепи, и эта особенность рецептора получила название цепецентричности. В настоящее время неизвестно, является ли цепецентричность врожденным свойством некоторых ТКР и каков механизм ее формирования. Целью работы было установить частоту встречаемости подобных рецепторов в репертуаре эффекторов и рестимулированных клеток памяти мыши, специфичных к антигенам аллогенной опухоли. Сформированные в ходе первичного иммунного ответа *in vivo* долгоживущие клетки памяти рестимулировали клетками иммунизирующей опухоли *in vitro*. Первичные эффекторы получали в культуре *in vitro* путем стимуляции T-клеток неиммунизированных мышей клетками этой же аллогенной опухоли. Методом NGS-секвенирования были созданы библиотеки ТКР эффекторов, вовлеченных в первичный и вторичный иммунный ответ. Для идентификации цепецентрических рецепторов были отобраны по 10 вариантов ТКР α из каждого репертуара. Путем трансдукции T-клетки intactных мышей модифицировали индивидуальными вариантами α -цепей ТКР с последующей оценкой уровня их пролиферации в присутствии специфических аллогенных стимуляторов. В ходе скрининга *in vitro* выявлено 10% цепецентрических рецепторов в пуле первичных эффекторов, при этом доля таких ТКР в репертуаре реактивированных клеток памяти составила 30%. Таким образом, цепецентричность является исходно присущим свойством некоторых ТКР, но вторичная антигенная стимуляция может быть фактором селекции клонотипов с такими рецепторами.

Ключевые слова: T-клеточный рецептор, цепецентричность, доминантно-активная α -цепь, первично активированные эффекторы, T-клетки памяти

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-15-00342 (2022–2024).

Благодарности: авторы благодарят О. Британову (ИБХ РАН) и К. Лупырь (Сколковский институт науки и технологий) за получение и биоинформатический анализ библиотек α -цепей ТКР мыши.

Вклад авторов: А. А. Калинина — планирование исследования, анализ литературы, проведение экспериментов, анализ и интерпретация результатов, написание статьи; М. В. Кубекина — клонирование; Н. А. Персиянцева — проведение трансфекций; А. В. Брутер — подбор олигонуклеотидов, клонирование; Л. М. Хромых — планирование исследования, анализ литературы, редактирование статьи; Д. Б. Казанский — планирование исследования, анализ литературы, анализ и интерпретация результатов, редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России (протокол № ЗП-10.06.2022 от 10 июня 2022 г.), проведено в строгом соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

✉ **Для корреспонденции:** Дмитрий Борисович Казанский
Каширское ш., д. 24, стр. 15, г. Москва, 115478, Россия; kazansky1@yandex.ru

Статья получена: 09.10.2024 **Статья принята к печати:** 30.10.2024 **Опубликована онлайн:** 30.11.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.052

T-CELL RECEPTOR CHAIN CENTRICITY IN THE PRIMARILY ACTIVATED EFFECTORS AND RE-STIMULATED MEMORY CELLS

Kalinina AA¹, Kubekina MV², Persiyantseva NA¹, Bruter AV^{1,2}, Khromykh LM¹, Kazansky DB¹✉

¹ Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

² Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Moscow, Russia

T cells, the adaptive immunity effectors, carry an antigen-recognizing T-cell receptor (TCR) that represents an $\alpha\beta$ heterodimer. Functional dominance of one chain has been reported for a number of TCRs. This feature is called chain centricity. Today, it is unclear whether chain centricity is an inherent feature of some TCRs, and what mechanism underlies its development. The study aimed to determine the abundance of such receptors in the repertoire of primarily activated effectors and re-stimulated memory cells of mice specific to the allogeneic tumor antigens. The long-lived memory cells formed in the primary immune response *in vivo* were *in vitro* re-stimulated with the immunizing tumor cells. Primary effectors were obtained *in vitro* in the culture by stimulation of T cells of non-immunized mice with cells of the same allogeneic tumor. TCR libraries of effectors involved in the primary and secondary immune response were created by NGS sequencing. To identify chain-centric TCRs, 10 TCR α variants were selected from each repertoire. T cells of intact mice were modified with individual TCR α -chain variants by transduction, with subsequent assessment of T cell proliferation under exposure to specific allogeneic stimulators. *In vitro* screening revealed 10% of chain-centric receptors in the primary effector pool, and the proportion of such TCRs in the repertoire of re-activated memory cells was 30%. Thus, chain centricity is an inherent property of some TCRs, but secondary antigenic stimulation can be a factor for selection of clonotypes with such receptors.

Keywords: T-cell receptor, chain centricity, dominant-active α -chain, primarily activated effectors, memory T cells

Funding: the study was supported by the RSF grant No. 22-15-00342 (2022–2024).

Acknowledgements: the authors would like to express their gratitude to O. Britanova (Institute of Bioorganic Chemistry RAS) and K. Lupyr (Skolkovo Institute of Science and Technology) for generation and bioinformatics analysis of the mouse TCR α -chain libraries.

Author contribution: Kalinina AA — study planning, literature review, experimental procedure, data analysis and interpretation, manuscript writing; Kubekina MV — cloning; Persiyantseva NA — transfection; Bruter AV — selection of oligonucleotides, cloning; Khromykh LM — study planning, literature review, data analysis and interpretation, manuscript editing; Kazansky DB — study planning, literature review, data analysis and interpretation, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Blokhin National Medical Research Center of Oncology (protocol No. ЗП-10.06.2022 dated 10 June 2022), it was conducted in strict compliance with the provisions of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry B. Kazansky
Kashirskoye Shosse, 24, bld. 15, Moscow, 115478, Russia; kazansky1@yandex.ru

Received: 09.10.2024 **Accepted:** 30.10.2024 **Published online:** 30.11.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.052

T-клетки являются важнейшими эффекторами адаптивного иммунитета. Для реализации своих функций они оснащены T-клеточным рецептором (ТКР), который участвует в распознавании пептидных антигенов, представленных собственными молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). ТКР представляет собой гетеродимер, в преобладающем типе T-клеток состоящий из α - и β -цепи. Согласно классической парадигме, обе цепи ТКР вносят равный вклад в распознавание МНС/пептидных комплексов. Однако для ряда ТКР было показано, что α - или β -цепь может доминировать во взаимодействии с антигеном и определять специфичность всего рецептора [1]. Около десяти лет назад был введен термин «цепецентричность ТКР» для описания данного феномена и ТКР с асимметричной функциональной активностью цепей получили название цепецентрических рецепторов [2, 3]. Это свойство некоторых ТКР может значительно упростить и повысить эффективность получения терапевтических T-клеточных продуктов для иммунотерапии инфекционных и онкологических заболеваний [1, 4].

На сегодняшний момент не известно, является ли цепецентричность врожденным свойством некоторых ТКР и каков механизм формирования подобных рецепторов. В большинстве исследований цепецентрические ТКР идентифицировали в иммунном репертуаре человека или мыши [2, 3, 5–7], что может указывать на экспрессию таких рецепторов преимущественно антиген-примированными T-клетками. Ранее было показано, что естественно сформированный пул T-клеток памяти мыши содержит около 20% цепецентрических рецепторов [4], но до конца не ясно, какова их доля в репертуаре эффекторов, вовлеченных в первичный иммунный ответ. Выяснение данного вопроса позволит установить важные аспекты природы цепецентрических ТКР: 1) является ли цепецентричность свойством, исходно присущим некоторым рецепторам; 2) какова роль антигенной стимуляции в формировании или отборе таких ТКР.

Цель данной работы заключалась в определении частоты встречаемости ТКР с доминантно-активной α -цепью в репертуаре первично активированных эффекторов и рестимулированных клеток памяти мыши.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали самок мышей инбредной линии C57BL/6 (гаплотип H2-K^b) (весом 18–20 г, 6–8-недельного возраста) из экспериментально-биологической лаборатории НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей (ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия). Животных содержали при стандартных условиях (20–24 °C, 40% относительной влажности, 12-часовой световой режим) и выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации. Для генерации клеток памяти *in vivo* девять мышей C57BL/6 иммунизировали клетками аллогенной мастоцитомы P815 (K^dD^d) путем однократного внутрибрюшинного введения 1×10^7 опухолевых клеток/мышь. Через два месяца после иммунизации [8] животных выводили из эксперимента, как указано выше, и стерильно извлекали селезенку. Клетки селезенки осторожно выдавливали из стромы органа в гомогенизаторе Поттера (DWK Life Sciences, Германия) в 3 мл PBS. Затем проводили цитометрический анализ спленоцитов на приборе FACSCantoII (BD, США) с использованием флуоресцентно

меченых антител (BioLegend, США) к поверхностным маркерам T-клеток: CD3-PE, CD8-Pacific blue, CD44-APC и CD62L-APC-Cy7. Клеточный дебрис исключали из анализа по показателям светорассеяния и включению пропидий йодида (BD, США). Долю T-клеток (%) в общей популяции живых лейкоцитов селезенки определяли по экспрессии маркера CD3. Относительное количество (%) цитотоксических CD8⁺-T-клеток анализировали в пуле CD3⁺-лимфоцитов. Сформированные после иммунизации *in vivo* долгоживущие CD8⁺-T-клетки памяти определяли по коэкспрессии маркеров CD44 и CD62L (рис. 1). Клетки селезенки P815-иммунизированных мышей без предварительной сортировки рестимулировали *in vitro* антигенами иммунизирующей опухоли [9]. Для этого спленоциты высевали в триплетах в круглодонные 96-луночные планшеты (Corning Costar, Sigma Aldrich, США) в количестве 4×10^5 клеток/луноку. Клетки мастоцитомы P815 обрабатывали цитостатиком митомицином C (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.; Япония) в дозе 50 мкг/мл в течение 60 мин при 37 °C и вносили к спленоцитам в соотношении 1 : 10. Клетки культивировали в 200 мкл среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), обогащенной 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, GE Healthcare, США), 0,01 мг/мл ципрофлаксацина (KRKA, Словения) и 10 мкМ 2-меркаптоэтанол (Merck, Германия), в течение 72 ч при 37 °C, 5% CO₂. Для индукции первично активированных CD8⁺-эффекторов клетки селезенки шести интактных (без иммунизации мастоцитомой P815) мышей C57BL/6 культивировали *in vitro* с клетками P815 в течение 72 ч, как описано выше. Для оценки фоновой пролиферации клетки селезенки интактных и иммунизированных мышей аналогично культивировали без P815. Уровень пролиферации (*counts per minute*) клеток в культуре спленоцитов измеряли по включению ³H-тимидина (1 мкКи/луноку) («Изотоп», Россия), который вносили за 8 ч до окончания культивирования. Индекс антиген-индуцированного ответа рассчитывали как соотношение уровня пролиферации спленоцитов в присутствии P815 к соответствующей фоновой пролиферации (рис. 2).

Клетки первично активированных эффекторов и рестимулированных клеток памяти, полученные, как описано выше, от одной интактной (неиммунизированной) и одной иммунизированной мыши соответственно, использовали для создания библиотек кДНК ТКР методом NGS-секвенирования на платформе MiSeq (Illumina, США) [9].

Полноразмерную кДНК α -цепи ТКР из каждого репертуара клонировали в ретровирусный вектор MigRI, содержащий промотор PGK [4]. Трансфекцию пакующей линии HEK293T проводили кальций-фосфатным методом. Для получения T-лимфоцитов, трансдуцированных индивидуальным вариантом ТКР α , проводили предварительную активацию T-клеток интактных (неиммунизированных) мышей. Для этого животных умерщвляли методом цервикальной дислокации, стерильно извлекали селезенку и брыжеечный лимфатический узел и выделяли клетки из этих органов, как описано выше. Полученные клетки затем активировали *in vitro* T-клеточным митогеном конканавалином A (3 мкг/мл) (Sigma Aldrich, США) в течение 24 ч и проводили трансдукцию путем двух спинокуляций с ретровирусами, содержащими индивидуальный вариант ТКР α , при 2000 \times g в течение 2 ч (22 °C) [10]. Уровень модификации лимфоцитов определяли через 48 ч методом проточной цитофлуориметрии по измерению экспрессии репортерного белка GFP в контрольной пробе T-клеток,

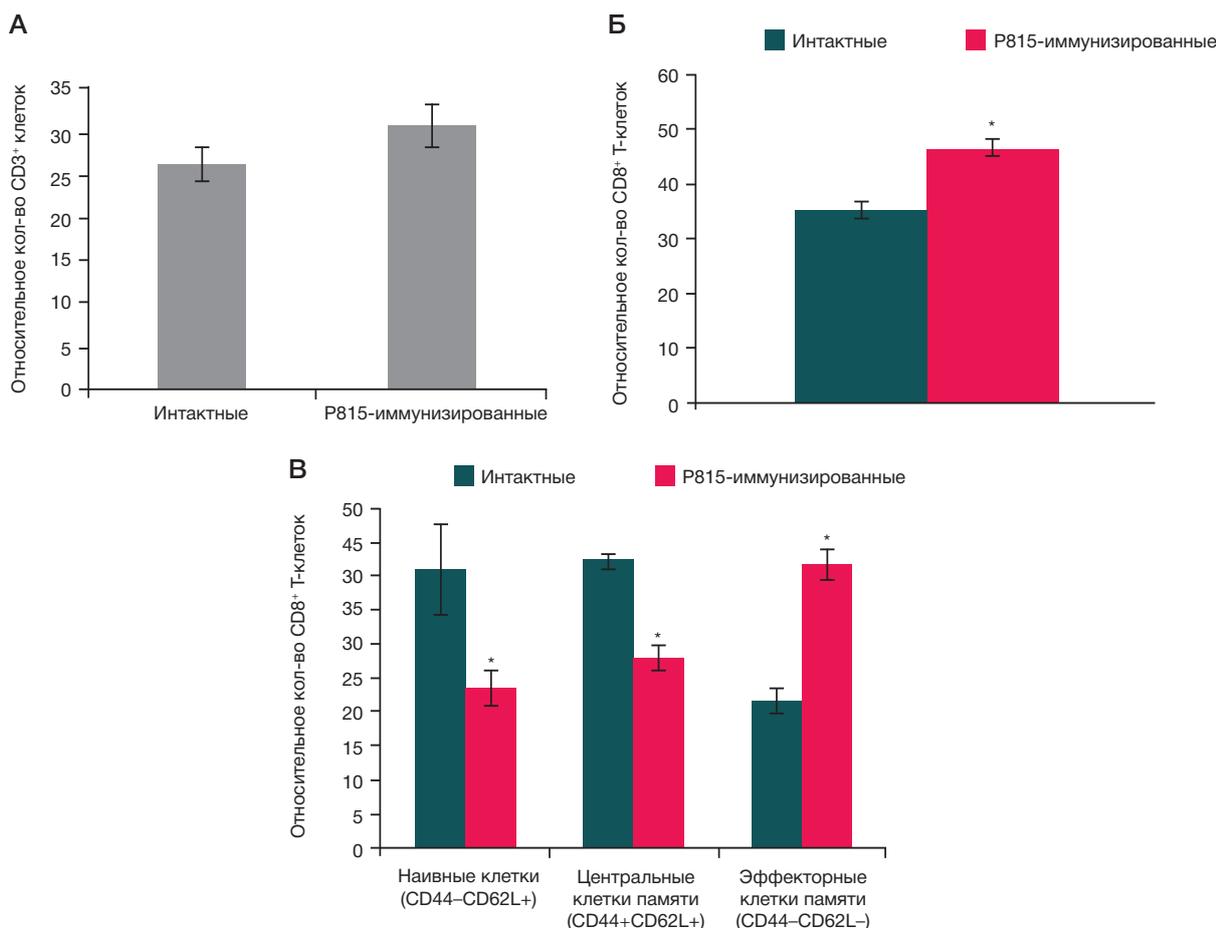


Рис. 1. Анализ Т-клеток селезенки мышей после *in vivo* иммунизации клетками аллогенной опухоли. Мышей C57BL/6 ($n = 9$) иммунизировали внутрибрюшинно клетками аллогенной мастоцитомы P815. Через 2 месяца после иммунизации клетки селезенки животных анализировали методом проточной цитофлуориметрии. В качестве контроля использовали спленоциты интактных (без иммунизации P815) мышей C57BL/6 ($n = 6$). **А)** Относительное количество (%) Т-клеток (CD3⁺). **Б)** Доля (%) цитотоксических CD8⁺ Т-клеток. **В)** Доля (%) CD8⁺ Т-клеток с фенотипом наивных клеток (CD44⁻CD62L⁺), центральных клеток памяти (CD44⁺CD62L⁺) и эффекторных клеток памяти (CD44⁻CD62L⁻). Данные представлены как $m \pm SEM$ ($n = 6-9$). * $p \leq 0,05$ по сравнению с интактным контролем (*t*-критерий Стьюдента)

аналогично трансдуцированных GFP-ретровирусом [10]. Эффективность трансдукции составила 40–70% (данные не представлены).

Через 48 ч после трансдукции Т-клетки высевали в триплетах в плоскостонные 96-луночные планшеты (Corning Costar, Sigma Aldrich, США) в количестве 1×10^5 кл./луноку. Клетки сингенной для мышей C57BL/6 лимфомы EL-4 и иммунизирующей мастоцитомы P815 обрабатывали митомицином С, как описано выше. Для определения уровня пролиферации модифицированных Т-клеток в присутствии сингенных стимуляторов, обработанные цитостатиком клетки EL-4 вносили к Т-лимфоцитам в соотношении 1 : 2. Для оценки уровня специфической антиген-индуцированной пролиферации модифицированные Т-клетки аналогично сокультивировали с клетками P815, обработанными митомицином С. Клетки культивировали в 200 мкл среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), обогащенной как описано выше, в течение 72 ч при 37 °С, 5% CO₂. В качестве контролей использовали нетрансдуцированные лимфоциты (НТЛ) и GFP-модифицированные Т-клетки. Для оценки уровня фоновой пролиферации Т-лимфоциты (НТЛ, ТКР α - и GFP-трансдуцированные) аналогично культивировали без опухолевых клеток. Уровень клеточной пролиферации оценивали с помощью набора CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, США) согласно рекомендациям производителя. Оптическую плотность (OD) измеряли на

микропланшетном спектрофотометре Infinite F50 (Tecan, Швейцария). Скрининг *in vitro* каждого варианта ТКР α проводили минимум в двух независимых экспериментах.

На рис. 1 и 2 представлены данные трех независимых экспериментов как средняя \pm стандартная ошибка среднего ($mean \pm SEM$) ($n = 6-9$). На рис. 3 представлены частоты уникальных клонотипов ТКР α в каждом из исследуемых репертуаров. На рис. 4 представлены данные одного из двух репрезентативных экспериментов как $mean \pm SEM$ для трех технических повторов. Статистический анализ проводили с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента после проверки нормальности распределения выборки по критерию Колмогорова–Смирнова. Различия признавали достоверными при $p < 0,05$. Статистический анализ проводили в программе Prism, v.8.1.2 (GraphPad, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе использовали экспериментальную модель генерации долгоживущих Т-клеток памяти, которая предусматривает *in vivo* иммунизацию мышей C57BL/6 (H2-K^b) клетками аллогенной мастоцитомы P815 (K^dD^b). В силу аллогенных различий в молекулах МНС класса I у реципиента развивается преимущественно CD8⁺-Т-клеточный ответ на трансплантируемую опухоль. В селезенке иммунизированных животных не отмечали

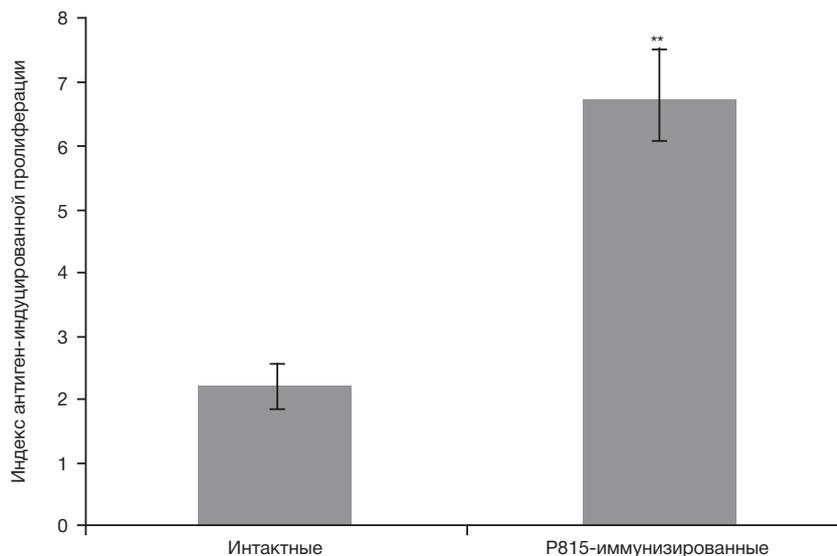


Рис. 2. Уровень антиген-индуцированной пролиферации *in vitro* Т-клеток при первичном и вторичном иммунном ответе на клетки аллогенной опухоли. Клетки селезенки интактных (без иммунизации P815) и P815-иммунизированных мышей C57BL/6 культивировали в присутствии аллогенной мастоцитомы P815 в течение 72 ч. Спленоциты, аналогично культивированные без антигенной стимуляции, использовали для оценки фоновой пролиферации. Индекс антиген-индуцированного пролиферативного ответа на аллоантигены рассчитывали, как описано в Материалах и методах. Данные представлены как $m \pm SEM$ ($n = 6-9$). ** $p \leq 0,01$ (t-критерий Стьюдента)

увеличения относительного количества Т-клеток по сравнению с интактными мышами (рис. 1А), однако доля CD8⁺-Т-клеток была достоверно увеличена после иммунизации по сравнению с контролем (рис. 1Б). Кроме того, среди CD8⁺-Т-клеток селезенки иммунизированных мышей отмечено накопление лимфоцитов с фенотипом эффекторных клеток памяти (CD44⁺CD62L⁻), доля которых возросла в 1,9 раза по сравнению с аналогичной популяцией CD8⁺-Т-клеток в селезенке интактных мышей (рис. 1В). Полученные данные свидетельствуют о формировании пула долгоживущих CD8⁺-клеток памяти по завершении первичного иммунного ответа *in vivo*.

Учитывая, что поверхностный активационный фенотип Т-клетки напрямую не коррелирует с опытом ее взаимодействия с антигеном и функциональным статусом [11], для подтверждения генерации истинных Т-клеток памяти в ходе *in vivo* иммунизации лимфоциты селезенки иммунизированных мышей рестимулировали *in vitro* антигенами иммунизирующей опухоли. В культуре *in vitro* был получен первичный пролиферативный ответ спленоцитов интактных мышей на клетки аллогенной мастоцитомы P815, который в два раза превышал значения фоновой пролиферации (рис. 2). При этом уровень антиген-индуцированной пролиферации спленоцитов иммунизированных животных в 3 раза превышал соответствующее значение в культуре клеток интактных мышей (рис. 2). Таким образом, функциональный тест *in vitro* показал первичный иммунный ответ на клетки аллогенной опухоли и усиленный вторичный ответ Т-клеток памяти.

Эту экспериментальную систему использовали для генерации эффекторов первичного и вторичного иммунного ответа на клетки аллогенной опухоли и создания библиотек их α -цепей ТКР (ТКР α). Для выявления клонотипов ТКР α , вовлеченных в иммунный ответ на антигены P815, репертуар первично активированных эффекторов и рестимулированных клеток памяти сравнили соответственно с репертуаром ТКР α неиммунизированных мышей и иммунизированных мышей без антигенной стимуляции *in vitro*. В каждой библиотеке были определены варианты ТКР α , частота которых после

стимуляции минимум в три раза превышала частоту этого же клонотипа в соответствующем репертуаре без антигенной стимуляции [9]. Для дальнейших исследований были отобраны по 10 вариантов ТКР α , уникальных для репертуара первично активированных эффекторов или рестимулированных клеток памяти (рис. 3).

Доминантно-активные ТКР α определяли в тест-системе *in vitro*. Для этого Т-клетки интактных мышей, модифицированные каждым вариантом ТКР α , помещали в культуру с сингенными стимуляторами (клетки EL-4) или специфическими аллогенными стимуляторами (клетки P815) (рис. 4). Соответствующую α -цепь считали доминантно-активной, если уровень пролиферации трансдуцированных лимфоцитов в присутствии P815 достоверно превышал уровень пролиферации этих же клеток без антигенной стимуляции (фон), в присутствии EL-4 (стимуляция сингенной опухоли), а также если он был достоверно выше значений антиген-индуцированной пролиферации НТЛ и GFP-модифицированных Т-клеток (рис. 4).

В результате скрининга была выявлена одна доминантно-активная ТКР α из репертуара первично активированных эффекторов (#3; рис. 4А); уровень пролиферативного ответа Т-клеток, модифицированных α -цепью ТКР #3, в присутствии специфического аллогенного стимулятора (клеток P815) в 1,3 раза ($p < 0,05$) превышал уровень их пролиферации в культуре с сингенными стимуляторами (клетками EL-4). В репертуаре реактивированных клеток памяти были выявлены три доминантно-активных варианта ТКР α : при специфической антигенной стимуляции клетками P815 Т-лимфоцитов, трансдуцированных ТКР α #2, ТКР α #5 и ТКР α #9, наблюдалось достоверное в 1,3 раза ($p < 0,05$) превышение уровня пролиферации по сравнению с пролиферацией в присутствии сингенных клеток EL-4 (рис. 4Б).

Таким образом, в ходе исследования было установлено, что репертуар первично активированных эффекторов содержит 10% целецентрических ТКР, тогда как доля таких рецепторов в репертуаре рестимулированных клеток памяти составляет 30%. Эта оценка предварительна

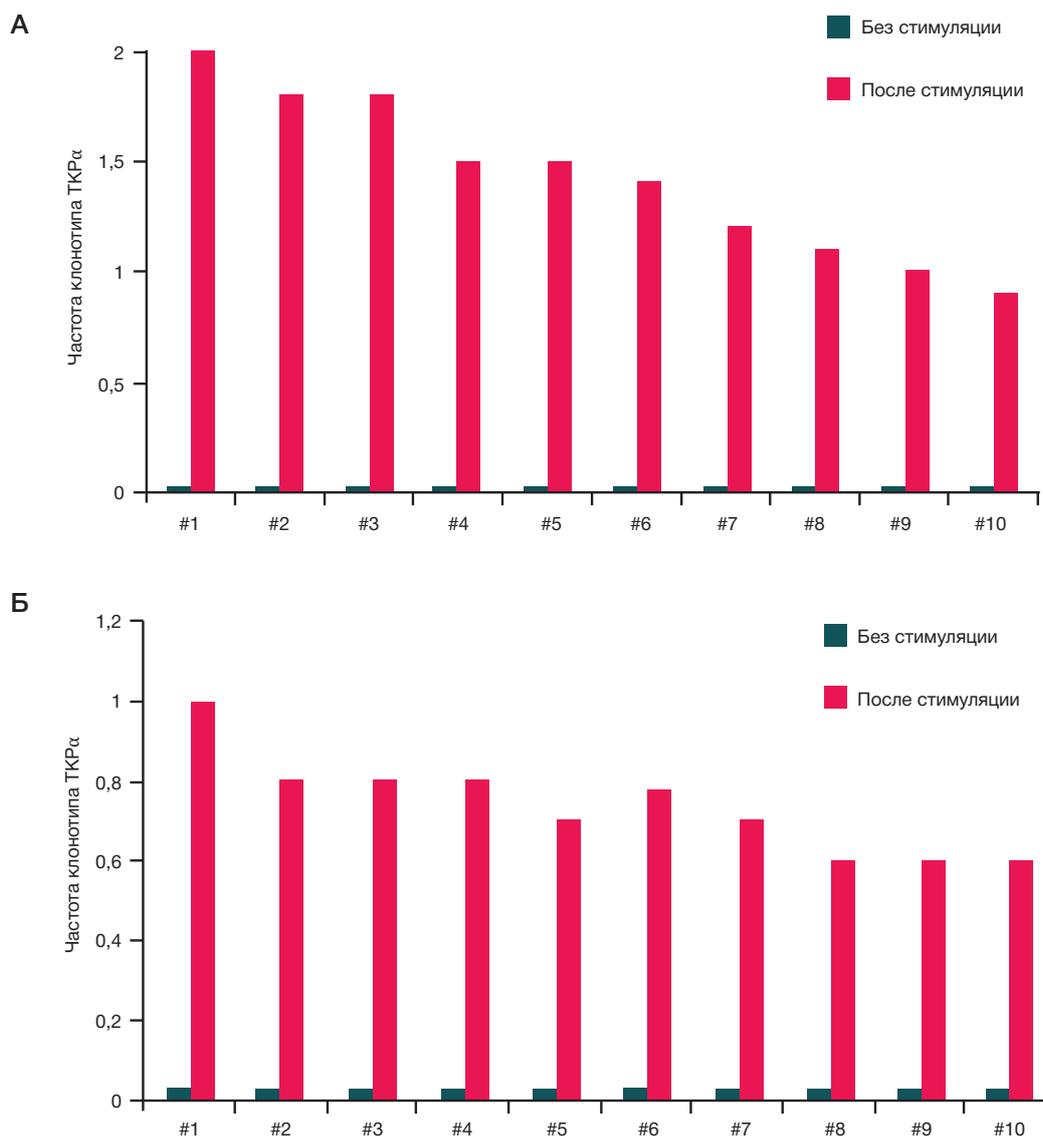


Рис. 3. Варианты α -цепей Т-клеточного рецептора, отобранные для скрининга *in vitro*. Частота встречаемости клонотипа α -цепи Т-клеточного рецептора в репертуаре эффекторов, вовлеченных в первичный иммунный ответ, (**А**) и рестимулированных Т-клеток памяти (**Б**)

и ее уточнение путем дальнейшего накопления данных продолжается.

В ходе скрининга *in vitro* были также выявлены отдельные варианты α -цепей ТКР (#9 в репертуаре первично активированных эффекторов (рис. 4А) и #1 в репертуаре рестимулированных Т-клеток памяти (рис. 4Б)), модификация которыми приводила к усиленной пролиферации Т-клеток в присутствии сингенной EL-4. Возможным объяснением этому может быть формирование рецептора с новой специфичностью в результате взаимодействия трансдуцированной α -цепи с эндогенной β -цепью ТКР в зрелом Т-лимфоците.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Используя ранее разработанную экспериментальную модель, мы проследили последовательные изменения в репертуаре ТКР мыши в ходе иммунного ответа на опухолевые аллоантигены, начиная с первичного ответа и заканчивая формированием иммунологической памяти и индукции вторичного ответа клеток памяти [8, 9]. Полученные данные показали, что ТКР с доминантно-активными α -цепями экспрессируют как первично активированные эффекторы,

так и рестимулированные Т-клетки памяти. Исходя из этого, можно предположить, что цепецентричность является врожденным свойством некоторых ТКР.

Интересную аналогию явлению можно найти в работе Dietrich et al., в которой исследовали преимунный репертуар Т-лимфоцитов, специфичных к меланома-ассоциированному аутоантигену melan-A. Было показано, что в melan-A-специфичных тимоцитах и зрелых периферических Т-клетках преимущественно используется определенный V-сегмент α -цепи (V α 2.1) [12]. Таким образом, сужение репертуара в пользу использования данного варианта α -цепи происходит в ходе внутритимусной селекции melan-A-специфичных Т-клеток, хотя преимущественное использование ими данного варианта ТКР α не указывает на функциональное доминирование α -цепи. Мы полагаем, что причины этого явления могут заключаться в возможности повторных реаранжировок генов α -цепей ТКР в ходе позитивной селекции в тимусе, приводящих к отбору их вариантов, способных к установлению большего числа контактов с эндогенными комплексами МНС/пептид и тем самым к более эффективной позитивной селекции.

Стоит отметить, что в наших экспериментах доля цепецентрических рецепторов в репертуаре

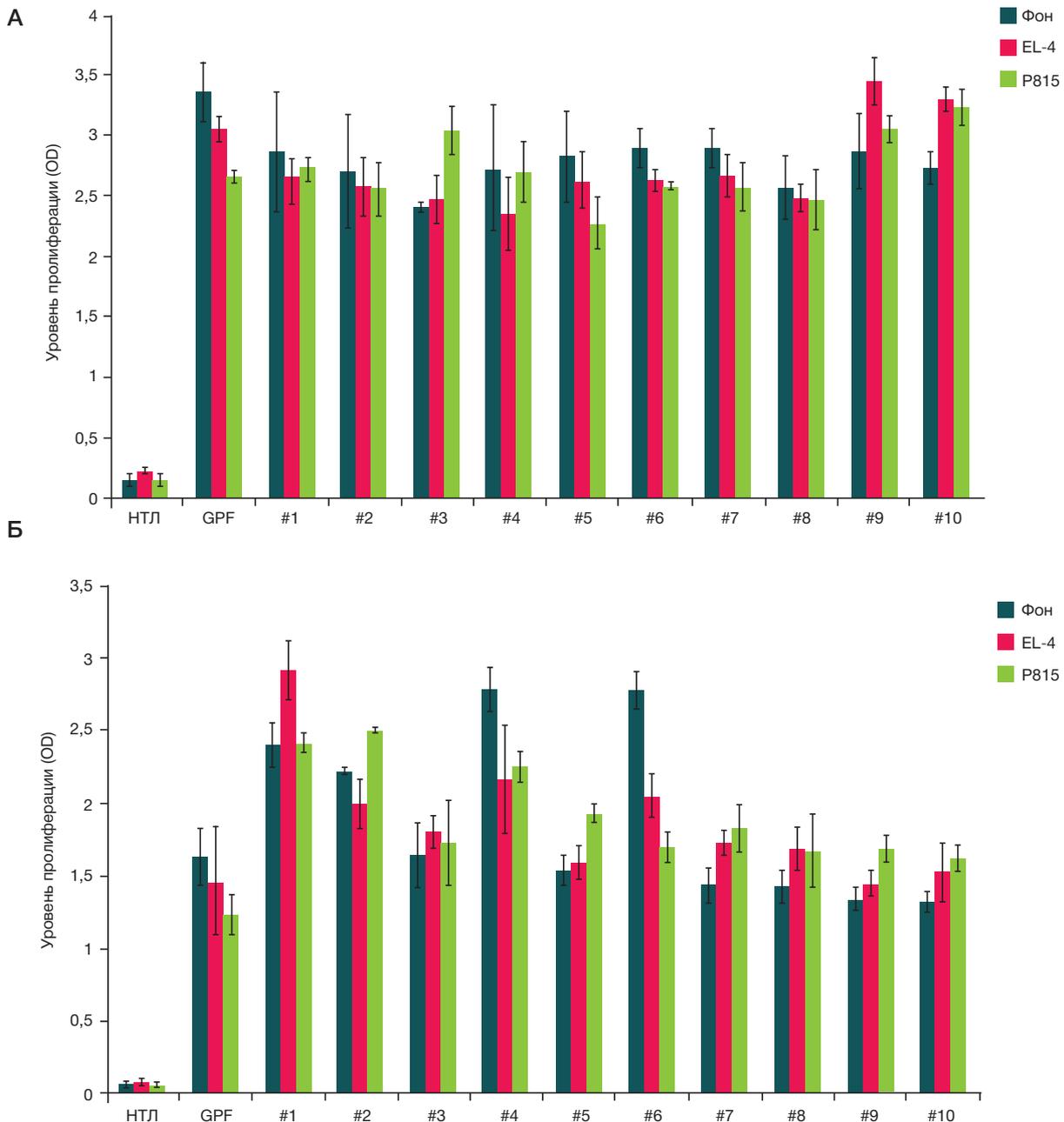


Рис. 4. Уровень антиген-индуцированной пролиферации *in vitro* Т-клеток, трансдуцированных индивидуальными вариантами α -цепи Т-клеточного рецептора (ТКР). Активированные Т-лимфоциты интактной мыши C57BL/6 трансдуцировали α -цепями ТКР из репертуара первично активированных эффекторов (**А**) или рестимулированных клеток памяти (**Б**). Модифицированные лимфоциты помещали в культуру с сингенными стимуляторами (клетки лимфомы EL-4) или аллогенными специфическими стимуляторами (клетки мастоцитомы P815) на 72 ч. Для оценки уровня фоновой пролиферации трансдуцированные Т-клетки культивировали без опухолевых клеток (фон). В качестве контроля использовали нетрансдуцированные активированные лимфоциты (НТЛ) и Т-клетки, модифицированные GFP. Представлены данные одного из двух репрезентативных экспериментов как $m \pm SEM$ для трех технических повторов. * $p \leq 0,05$ (*t*-критерий Стьюдента)

реактивированных клеток памяти была выше (30% против 10% в репертуаре первично активированных эффекторов), что может указывать на селекцию клонов ТКР с доминантно-активными α -цепями в ходе вторичной специфической антигенной стимуляции. Биоинформатический анализ всего репертуара ТКР этих двух функциональных групп показал, что физико-химические характеристики ТКР α в пуле реактивированных клеток памяти существенно отличались от свойств α -цепей ТКР эффекторов, вовлеченных в первичный иммунный ответ [9]. Согласно полученным данным, во вторичном ответе репертуар ТКР обогащается рецепторами, содержащими α -цепь с повышенной силой

взаимодействия с МНС/пептидными комплексами и кросс-реактивностью [9].

Известно, что ТКР клеток памяти обладают повышенной аффинностью к антигену [13, 14]. Результаты наших исследований указывают на то, что это может быть обусловлено, в том числе, и экспрессией доминантно-активной ТКР α . Таким образом, отбор центрических ТКР может быть одним из механизмов созревания функциональной avidности антиген-примированных Т-клеток [15–17].

В свете имеющихся на сегодняшний день данных мы полагаем, что функционально истинные Т-клетки памяти могут быть наиболее перспективным источником

терапевтических ТКР. Ранее в экспериментальных моделях *in vivo* было показано, что доминантно-активные α -цепи цепецентрических ТКР клеток памяти можно успешно использовать для получения Т-клеточных продуктов для адоптивной иммунотерапии онкологических и инфекционных заболеваний [4, 7].

Описанную в данной работе систему скрининга *in vitro* можно также применять для оценки возможной аутореактивности модифицированных Т-клеток. При трансдукции индивидуальной α -цепи ТКР в Т-лимфоциты происходит ее связывание с эндогенно реаранжированными β -цепями, в результате чего может сформироваться рецептор с новой специфичностью, в том числе потенциально аутореактивный ТКР. Так, в нашем исследовании мы обнаружили повышенную пролиферативную активность Т-клеток, модифицированных двумя вариантами ТКР α , в присутствии сингенных стимуляторов (рис. 4А, #9; рис. 4Б, #1). Однако установление аутореактивности этих трансдуцированных Т-клеток выходило за рамки данной работы. Между тем, ранее мы показали, что Т-лимфоциты, модифицированные доминантно-активной ТКР α , не проявляют неспецифической цитотоксичности при адоптивном переносе сингенным реципиентам, что подтверждает отсутствие или низкую долю потенциально

аутореактивных клонов в полученном Т-клеточном продукте [18].

Выводы

В данном исследовании была разработана система скрининга *in vitro* цепецентрических ТКР мыши. С ее помощью идентифицированы доминантно-активные антиген-специфичные α -цепи в репертуаре эффекторов, вовлеченных в первичный иммунный ответ, и в репертуаре клеток памяти после вторичной специфической антигенной стимуляции. Результаты работы показали, что 10% ТКР первично активированных эффекторов являются цепецентрическими. Таким образом, данное свойство изначально присуще некоторым Т-клеточным рецепторам. При этом в ходе вторичного иммунного ответа доля таких рецепторов увеличивается в три раза, что может свидетельствовать об обогащении репертуара цепецентрическими ТКР вследствие антиген-индуцированной селекции клонотипов с такими рецепторами. Полученные данные позволят усовершенствовать процесс идентификации и отбора цепецентрических антиген-специфичных ТКР, которые являются привлекательным источником терапевтических рецепторов для адоптивной иммунотерапии.

Литература

1. Kalinina AA, Khromykh LM, Kazansky DB. T Cell Receptor Chain Centricity: The Phenomenon and Potential Applications in Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2023; 24: 15211.
2. Ochi T, Nakatsugawa M, Chamoto K, Tanaka S, Yamashita Y, Guo T, et al. Optimization of T-cell Reactivity by Exploiting TCR Chain Centricity for the Purpose of Safe and Effective Antitumor TCR Gene Therapy. *Cancer Immunol Res.* 2015; 3: 1070–81.
3. Nakatsugawa M, Yamashita Y, Ochi T, Tanaka S, Chamoto K, Guo T, et al. Specific roles of each TCR hemichain in generating functional chain-centric TCR. *J Immunol.* 2015; 194: 3487–500.
4. Kalinina AA, Nesterenko LN, Bruter AV, Balunets DV, Chudakov DM, Izraelson M, et al. Adoptive Immunotherapy Based on Chain-Centric TCRs in Treatment of Infectious Diseases. *iScience.* 2020; 23 (12): 101854.
5. Brändle D, Brduscha-Riem K, Hayday AC, Owen MJ, Hengartner H, Pircher H. T cell development and repertoire of mice expressing a single T cell receptor alpha chain. *Eur J Immunol.* 1995; 25: 2650–5.
6. Mori L, Loetscher H, Kakimoto K, Bluethmann H, Steinmetz M. Expression of a transgenic T cell receptor beta chain enhances collagen-induced arthritis. *J Exp Med.* 1992; 176: 381–88.
7. Zamkova MA, Kalinina AA, Silaeva YY, Persiyantseva NA, Bruter AV, Deikin AV, et al. Dominant role of the α -chain in rejection of tumor cells bearing a specific alloantigen in TCR transgenic mice and in *in vitro* experiments. *Oncotarget.* 2019; 10: 4808–21.
8. Grinenko TS, Pobezinskaya EL, Pobezinskii LA, Baturina IA, Zvezdova ES, Kazanskii DB. Suppression of primary allogenic response by CD8+ memory cells. *Bull Exp Biol Med.* 2005; 140 (5): 545–9.
9. Kalinina AA, Persiyantseva NA, Britanova OV, Lupyr K, Shagina I, Khromykh LM et al. Unique features of the TCR repertoire of reactivated memory T cells in the experimental mouse tumor model. *Comput Struct Biotechnol J.* 2023; 21: 3196–209.
10. Kalinina A, Bruter A, Nesterenko L, Khromykh L, Kazansky D. Generation of TCR α -transduced T cells for adoptive transfer therapy of salmonellosis in mice. *STAR Protoc.* 2021; 2 (1): 100368.
11. Kalinina AA, Khromykh LM, Kazansky DB, Deykin AV, Silaeva YY. Suppression of the immune response by syngeneic splenocytes adoptively transferred to sublethally irradiated mice. *Acta Nat.* 2021; 13 (1): 116–26.
12. Dietrich PY, Le Gal FA, Dutoit V, Pittet MJ, Trautman L, Zippelius A, et al. Prevalent role of TCR alpha-chain in the selection of the preimmune repertoire specific for a human tumor-associated self-antigen. *J Immunol.* 2003; 170: 5103–9.
13. Hebeisen M, Allard M, Gannon PO, Schmidt J, Speiser DE, Rufer N. Identifying individual T cell receptors of optimal avidity for tumor antigens. *Front Immunol.* 2015; 6: 582.
14. Mondino A, Manzo T. To remember or to forget: the role of good and bad memories in adoptive T cell therapy for tumors. *Front Immunol.* 2020; 11: 1915.
15. von Essen MR, Kongsbak M, Geisler C. Mechanisms behind functional avidity maturation in T cells. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 163453.
16. Giffillan CB, Hebeisen M, Rufer N, Speiser DE. Constant regulation for stable CD8 T-cell functional avidity and its possible implications for cancer immunotherapy. *Eur J Immunol.* 2021; 51 (6): 1348–60.
17. Campillo-Davo D, Flumens D, Lion E. The quest for the best: how TCR affinity, avidity, and functional avidity affect TCR-engineered T-cell antitumor responses. *Cells.* 2020; 9(7): 1720.
18. Kalinina A, Bruter A, Persiyantseva N, Silaeva Y, Zamkova M, Khromykh L et al. Safety evaluation of the mouse TCR α - transduced T cell product in preclinical models *in vivo* and *in vitro*. *Biomed Pharmacother.* 2022; 145: 112480.

References

1. Kalinina AA, Khromykh LM, Kazansky DB. T Cell Receptor Chain Centricity: The Phenomenon and Potential Applications in Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2023; 24: 15211.
2. Ochi T, Nakatsugawa M, Chamoto K, Tanaka S, Yamashita Y, Guo T, et al. Optimization of T-cell Reactivity by Exploiting TCR Chain Centricity for the Purpose of Safe and Effective Antitumor TCR

- Gene Therapy. *Cancer Immunol Res.* 2015; 3: 1070–81.
3. Nakatsugawa M, Yamashita Y, Ochi T, Tanaka S, Chamoto K, Guo T, et al. Specific roles of each TCR hemichain in generating functional chain-centric TCR. *J Immunol.* 2015; 194: 3487–500.
 4. Kalinina AA, Nesterenko LN, Bruter AV, Balunets DV, Chudakov DM, Izraelson M, et al. Adoptive Immunotherapy Based on Chain-Centric TCRs in Treatment of Infectious Diseases. *iScience.* 2020; 23 (12): 101854.
 5. Brändle D, Brduscha-Riem K, Hayday AC, Owen MJ, Hengartner H, Pircher H. T cell development and repertoire of mice expressing a single T cell receptor alpha chain. *Eur J Immunol.* 1995; 25: 2650–5.
 6. Mori L, Loetscher H, Kakimoto K, Bluethmann H, Steinmetz M. Expression of a transgenic T cell receptor beta chain enhances collagen-induced arthritis. *J Exp Med.* 1992; 176: 381–88.
 7. Zamkova MA, Kalinina AA, Silaeva YY, Persiyantseva NA, Bruter AV, Deikin AV, et al. Dominant role of the α -chain in rejection of tumor cells bearing a specific alloantigen in TCR transgenic mice and in in vitro experiments. *Oncotarget.* 2019; 10: 4808–21.
 8. Grinenko TS, Pobezinskaya EL, Pobezinskii LA, Baturina IA, Zvezdova ES, Kazanskii DB. Suppression of primary allogenic response by CD8+ memory cells. *Bull Exp Biol Med.* 2005; 140 (5): 545–9.
 9. Kalinina AA, Persiyantseva NA, Britanova OV, Lupyr K, Shagina I, Khromykh LM et al. Unique features of the TCR repertoire of reactivated memory T cells in the experimental mouse tumor model. *Comput Struct Biotechnol J.* 2023; 21: 3196–209.
 10. Kalinina A, Bruter A, Nesterenko L, Khromykh L, Kazansky D. Generation of TCR α -transduced T cells for adoptive transfer therapy of salmonellosis in mice. *STAR Protoc.* 2021; 2 (1): 100368.
 11. Kalinina AA, Khromykh LM, Kazansky DB, Deykin AV, Silaeva YY. Suppression of the immune response by syngeneic splenocytes adoptively transferred to sublethally irradiated mice. *Acta Nat.* 2021; 13 (1): 116–26.
 12. Dietrich PY, Le Gal FA, Dutoit V, Pittet MJ, Trautman L, Zippelius A, et al. Prevalent role of TCR alpha-chain in the selection of the preimmune repertoire specific for a human tumor-associated self-antigen. *J Immunol.* 2003; 170: 5103–9.
 13. Hebeisen M, Allard M, Gannon PO, Schmidt J, Speiser DE, Rufer N. Identifying individual T cell receptors of optimal avidity for tumor antigens. *Front Immunol.* 2015; 6: 582.
 14. Mondino A, Manzo T. To remember or to forget: the role of good and bad memories in adoptive T cell therapy for tumors. *Front Immunol.* 2020; 11: 1915.
 15. von Essen MR, Kongsbak M, Geisler C. Mechanisms behind functional avidity maturation in T cells. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 163453.
 16. Gilfillan CB, Hebeisen M, Rufer N, Speiser DE. Constant regulation for stable CD8 T-cell functional avidity and its possible implications for cancer immunotherapy. *Eur J Immunol.* 2021; 51 (6): 1348–60.
 17. Campillo-Davo D, Flumens D, Lion E. The quest for the best: how TCR affinity, avidity, and functional avidity affect TCR-engineered T-cell antitumor responses. *Cells.* 2020; 9(7): 1720.
 18. Kalinina A, Bruter A, Persiyantseva N, Silaeva Y, Zamkova M, Khromykh L et al. Safety evaluation of the mouse TCR α - transduced T cell product in preclinical models in vivo and in vitro. *Biomed Pharmacother.* 2022; 145: 112480.