

Analisi esaustiva dello stato delle cellule T in seguito ad attivazione tramite un pannello di immunofenotipizzazione a 16 colori sul sistema NovoCyte Advanteon

Autori

Lauren Jachimowicz,
Ming Li, Peifang Ye, Yan Lu e
Garret Guenther
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Le cellule T sono una componente essenziale della risposta immunitaria, grazie alla capacità di riconoscere ed eliminare patogeni estranei e cellule tumorali. Tuttavia, al fine di prevenire autoimmunità e immunopatologie è necessario un preciso controllo della risposta delle cellule T. Un pannello di immunofenotipizzazione delle cellule T a 16 colori è stato sviluppato per il sistema Agilent NovoCyte Advanteon con l'obiettivo di analizzare in maniera simultanea la differenziazione, l'attivazione, l'esaurimento e la produzione funzionale delle cellule T tramite degranulazione ed espressione di citochine. In linea teorica, questo metodo permetterà un'analisi esaustiva della funzione delle cellule T nella risposta immunitaria.

Introduzione

Il ruolo del sistema immunitario consiste nel combattere i patogeni limitando al tempo stesso l'autoimmunità. Le cellule T sono una componente importante della risposta immunitaria adattativa, essendo capaci di riconoscere specifici antigeni e risolvere le infezioni. Nei casi di risposta immunitaria normale, le cellule T vengono attivate in modo da dividersi rapidamente e distruggere tutte le cellule infette o cancerogene. L'attivazione tramite il recettore delle cellule T (TCR) e i recettori costimolatori deve essere bilanciata con i recettori inibitori quali la proteina 1 della morte cellulare programmata (PD-1), il gene 3 di attivazione dei linfociti (LAG-3) e la proteina 3 che contiene il dominio immunoglobulinico delle cellule T e il dominio della mucina (TIM-3). Ciò è necessario per prevenire l'insorgenza di autoimmunità e immunopatologie.

In presenza di stimolazione sostenuta delle cellule T, vi è un progressivo incremento dell'espressione dei recettori inibitori e una riduzione della funzione effettrice e della capacità proliferativa delle cellule T (esaurimento delle cellule T). Ciò è osservabile nel corso di un'infezione cronica o del cancro. Sui recettori inibitori si è concentrato l'interesse della ricerca nel campo dell'immunoterapia tumorale in quanto l'inversione dell'espressione di tali recettori tramite il blocco degli inibitori dei checkpoint ha ripristinato la funzione delle cellule T e migliorato l'immunità tumorale nella pratica clinica. La gravità dell'esaurimento delle cellule T è fortemente correlata alla co-espressione di più recettori inibitori, il che rende promettente la politerapia che ha come target vari recettori inibitori, con conseguente aumento dell'immunità tumorale. La sola analisi dell'espressione dei recettori inibitori delle cellule T non fornisce una visione completa dello stato delle cellule T. La misura di ulteriori marker della differenziazione, dell'attivazione, della precedente esposizione ad antigeni, della degranulazione e della produzione di citochine da parte delle cellule T fornisce una comprensione più completa.

Gli studi hanno individuato differenze intrinseche nell'espressione dei recettori inibitori tra sottoinsiemi di cellule T naïve, effettrici e di memoria. Un pannello di immunofenotipizzazione a 16 colori è stato ideato per l'uso sul sistema NovoCyte Advanteon (Tabella 1) al fine di esaminare la differenziazione e lo stato di attivazione di cellule T CD4 e CD8 e misurare le risposte funzionali delle cellule T. Sfruttando l'alta capacità di analisi multiparametrica del sistema NovoCyte Advanteon, i dati raccolti offrono una visione completa delle variazioni cinetiche che si verificano in sottoinsiemi di cellule T e nella funzione in seguito a stimolazione.

Analisi approfondita dello stato delle cellule T in seguito a stimolazione del TCR

Per un esame completo della risposta delle cellule T all'attivazione del TCR, sono stati presi in considerazione i marker della differenziazione, dell'attivazione e dei recettori inibitori oltre che della degranulazione e della produzione di citochine nelle cellule T CD4 e CD8 (Tabella 1). Cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC) isolate sono state stimulate con anticorpi anti-CD3,

anti-CD28 e interleuchina-2 (IL-2) per indurre l'attivazione delle cellule T. Sei ore prima dell'analisi citometrica a flusso, la secrezione di citochine è stata bloccata tramite un inibitore del trasporto di proteine. Le misure sui campioni sono state eseguite inizialmente dopo due e quattro giorni in coltura e nuovamente il giorno 5 dopo ristimolazione.

In Figura 1 è illustrata una strategia di gating rappresentativa per il campione al giorno 4. In primo luogo, le cellule morte sono state escluse utilizzando un colorante vitale seguito dall'esame della frequenza delle cellule T CD4 e CD8 all'interno della popolazione totale di cellule T CD3. Successivamente, la differenziazione delle cellule T è stata valutata determinando la frequenza relativa dei sottoinsiemi di cellule T in base all'espressione di superficie di CD45RA e CCR7. Le cellule T vengono separate in simil-naïve $T_{naïve-like}$ (CD45RA+/CCR7+), T_{CM} di memoria centrale (CD45RA-/CCR7+), T_{EM} di memoria effettrice (CD45RA-/CCR7-) e T_{EMRA} di memoria effettrice CD45RA+ (CD45RA+/CCR7+). Inoltre, le cellule $T_{naïve-like}$ vengono separate in vere ($T_{naïve}$) e cellule staminali T di memoria (T_{SCM}) tramite l'espressione di CD95 su T_{SCM} .

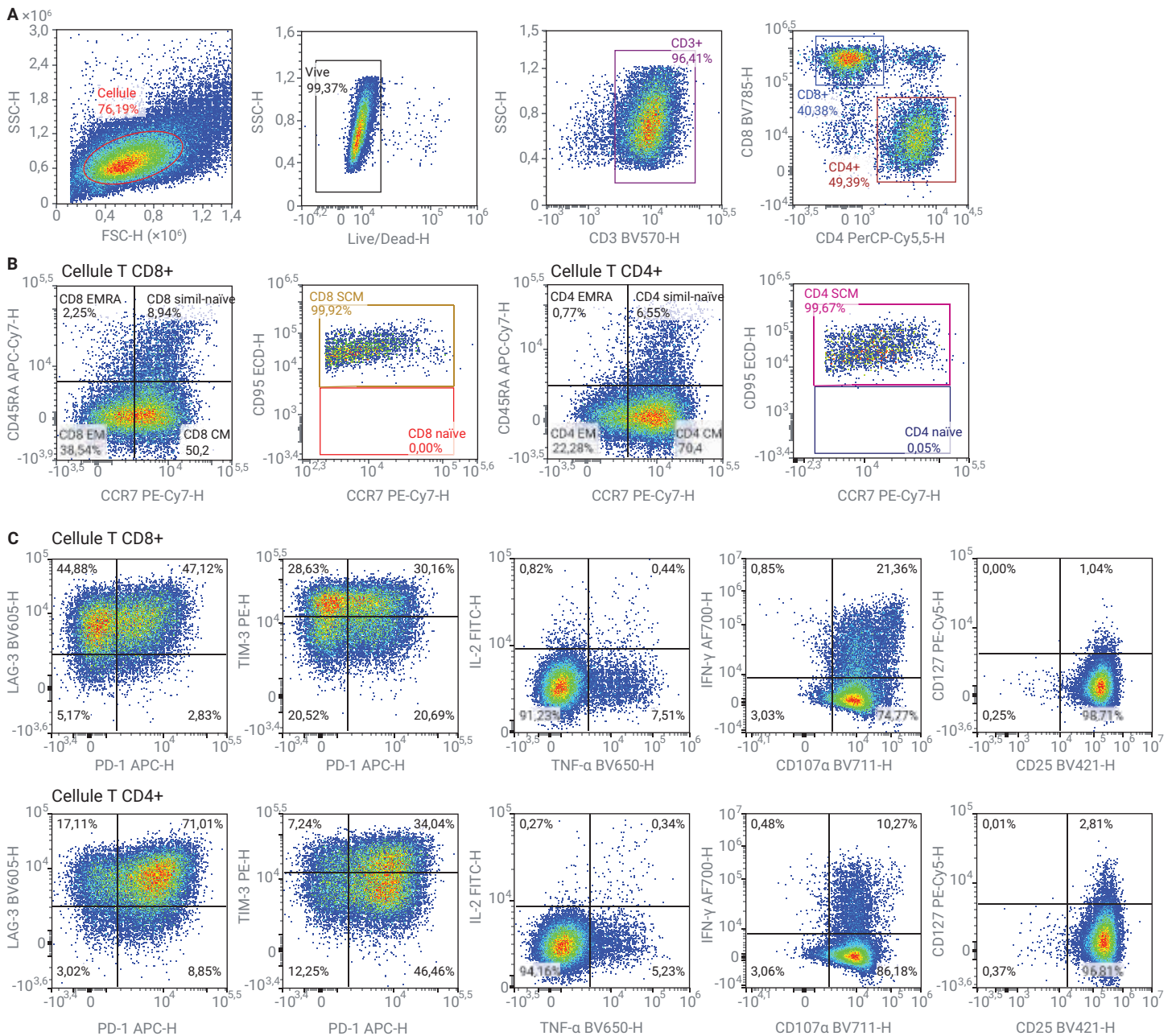
Tabella 1. Fluorocromi impiegati con il pannello di immunofenotipizzazione a 16 colori.

Marker	Fluorocromo	Clone	Finalità
Live/Dead	AVID		Vitalità
CD3	BV570	UCHT1	Lignaggio
CD4	PerCP-Cy5.5	RPA-T4	
CD8	BV785	SK1	
CD45RA	APC-Cy7	HI100	
CCR7	PE-Cy7	G043H7	Attivazione/differenziazione
CD25	BV421	M-A251	
CD127	PE-Cy5	A019D5	
CD95	PE-Dazzle594	DX2	
PD-1	APC	EH12.2H7	Recettori inibitori
TIM-3	PE	F38-2E2	
LAG-3	BV605	11C3C65	
IL-2	FITC	MQ1-17H12	Citochina
IFN- γ	AF700	B27	
TNF- α	BV650	MAb11	
CD107 α	BV711	H4A3	Degranulazione

È stata quindi esaminata l'espressione dei recettori inibitori PD-1, TIM-3, e LAG-3, così come dei marker di attivazione CD25 e CD127. Questi marker forniscono ulteriori informazioni sullo stato di attivazione delle cellule T. Infine sono state misurate la produzione di citochine IL-2, fattore di necrosi tumorale alfa (TNF α) e interferone gamma (IFN γ), oltre alla degranolazione tramite espressione di CD107 α , che demarca le cellule T citolitiche. Tutti i gate sono stati determinati con l'uso di controlli di fluorescenza meno uno

(FMO) (Figura 1D). Quattro giorni dopo la stimolazione, l'attivazione era avvenuta per la maggior parte delle cellule T e non erano più presenti cellule T_{naïve} nelle due popolazioni di cellule T CD4 e CD8. Sono state osservate un'ampia up-regulation nell'espressione di CD25 e down-regulation di CD127 nelle cellule T, in linea con l'alta attivazione delle cellule T. Sia le cellule T CD4 che CD8 presentavano up-regulation dell'espressione dei recettori inibitori, sebbene non tutte le cellule presentassero espressione positiva.

Era presente anche produzione di citochine TNF α e IFN γ , mentre è stata osservata una produzione minima di IL-2. La maggior parte delle cellule T era anche CD107 α positiva, a dimostrazione del loro potenziale citolitico. Questo pannello di colorazione ad alto numero di parametri per il sistema NovoCyte Advanteon permette un'analisi esaustiva delle cellule T in seguito a stimolazione. Sono state quindi esaminate le variazioni cinetiche nei parametri misurati nelle cellule T dopo l'attivazione del TCR.



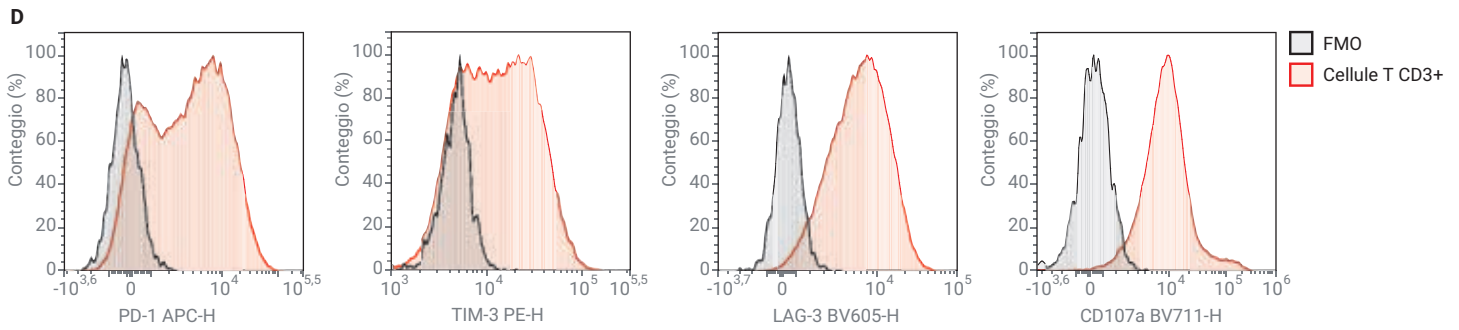


Figura 1. Immunofenotipizzazione di PBMC stimolate tramite un pannello di citofluorimetria a flusso a 16 colori. PBMC isolate da sangue di donatori sono state stimolate con 5 $\mu\text{g/mL}$ di anticorpo anti-CD3, 2 $\mu\text{g/mL}$ di anticorpo anti-CD28 e 100 ng/mL di IL-2. Le PBMC stimolate sono state colorate con il pannello di immunofenotipizzazione a 16 colori (Tabella 1) il giorno 4. Un cocktail di inibitore del trasporto di proteine (2 μL /pozzetto) e anticorpo anti-CD107a BV711 (5 $\mu\text{L/mL}$) sono stati aggiunti direttamente nei pozzetti per sei ore prima dell'analisi. (A) Strategia di gating. FSC-H ed SSC-H sono stati utilizzati per discriminare le cellule target dai detriti; le cellule morte sono state escluse tramite colorante Live/Dead. Il CD3 è stato utilizzato per identificare le cellule T. Il gating successivo delle cellule CD3+ ha identificato le cellule T CD4+ e CD8+. In seguito al gating su cellule CD4+ o CD8+, le cellule T_{CM} , T_{EM} e T_{EMRA} sono state identificate in base all'espressione differenziale di CD45RA e CCR7. Dalla popolazione CD45RA+CCR7+, sono state ulteriormente rilevate le cellule T CD95+ TSCM e CD95- naive (B). Nei sottoinsiemi di cellule T CD4+ e CD8+ sono stati anche esaminati il livello di espressione di CD25 e CD127, il livello di esaurimento di PD-1, LAG-3 e TIM-3, il livello di secrezione di citochine IL-2, TNF- α , e IFN- γ e il livello di degranolazione di CD107a. I dati qui mostrati si riferiscono al campione raccolto il giorno 4. (D) Controlli FMO. I gate sono stati definiti utilizzando controlli FMO. In alto sono mostrati i controlli FMO di PD-1, TIM-3, LAG-3 e CD107a. I campioni sono stati acquisiti sul sistema Agilent NovoCyte Advanteon e analizzati con il software NovoExpress.

Presenza di cambiamenti continui nello stato di differenziazione delle cellule T in seguito a stimolazione

L'attivazione del TCR induce rapidi cambiamenti nella differenziazione delle cellule T. Lo stato della differenziazione è stato esaminato identificando ciascun sottoinsieme: T_{naive} , T_{SCM} , T_{CM} , T_{EM} e T_{EMRA} come descritto nella sezione precedente. Studi precedenti hanno identificato differenze funzionali tra sottoinsiemi di cellule T; T_{naive} e T_{CM} possiedono un'alta capacità proliferativa ma sono prive di funzione effettrice rapida, mentre T_{EM} e T_{EMRA} possiedono una minore capacità

proliferativa ma capacità effettrici più ampie. T_{SCM} hanno conosciuto stimolazione antigenica ma mantengono le stesse proprietà simil-staminali di auto-rigenerazione delle cellule T_{naive} . Per comprendere i cambiamenti nella differenziazione delle cellule T dopo la stimolazione, sono state esaminate le frequenze relative di tutti i sottoinsiemi di cellule T in PBMC non stimolate e stimolate dopo due e quattro giorni e PBMC ristimolate al giorno 5 (Figura 2). Come previsto, la frequenza di cellule T_{naive} decresce drasticamente dopo due giorni di stimolazione del TCR; la maggior

parte delle cellule CD45RA+ CCR7+ è T_{SCM} in quanto esprimono anche CD95 (Figura 2B). Ciò è tipico dell'attivazione *ex vivo* con anticorpo anti-CD3/anti-CD28 poiché dovrebbe attivare tutte le cellule T presenti. La frazione di T_{CM} aumenta costantemente nel tempo in seguito alla stimolazione ma decresce dopo la ristimolazione (campione del giorno 5). Ciò indica che la ristimolazione induce il passaggio delle cellule T a un fenotipo effettrice. Nel complesso, la stimolazione *ex vivo* di PBMC induce la differenziazione rapida delle cellule T in più sottoinsiemi di cellule effettrici e di memoria.

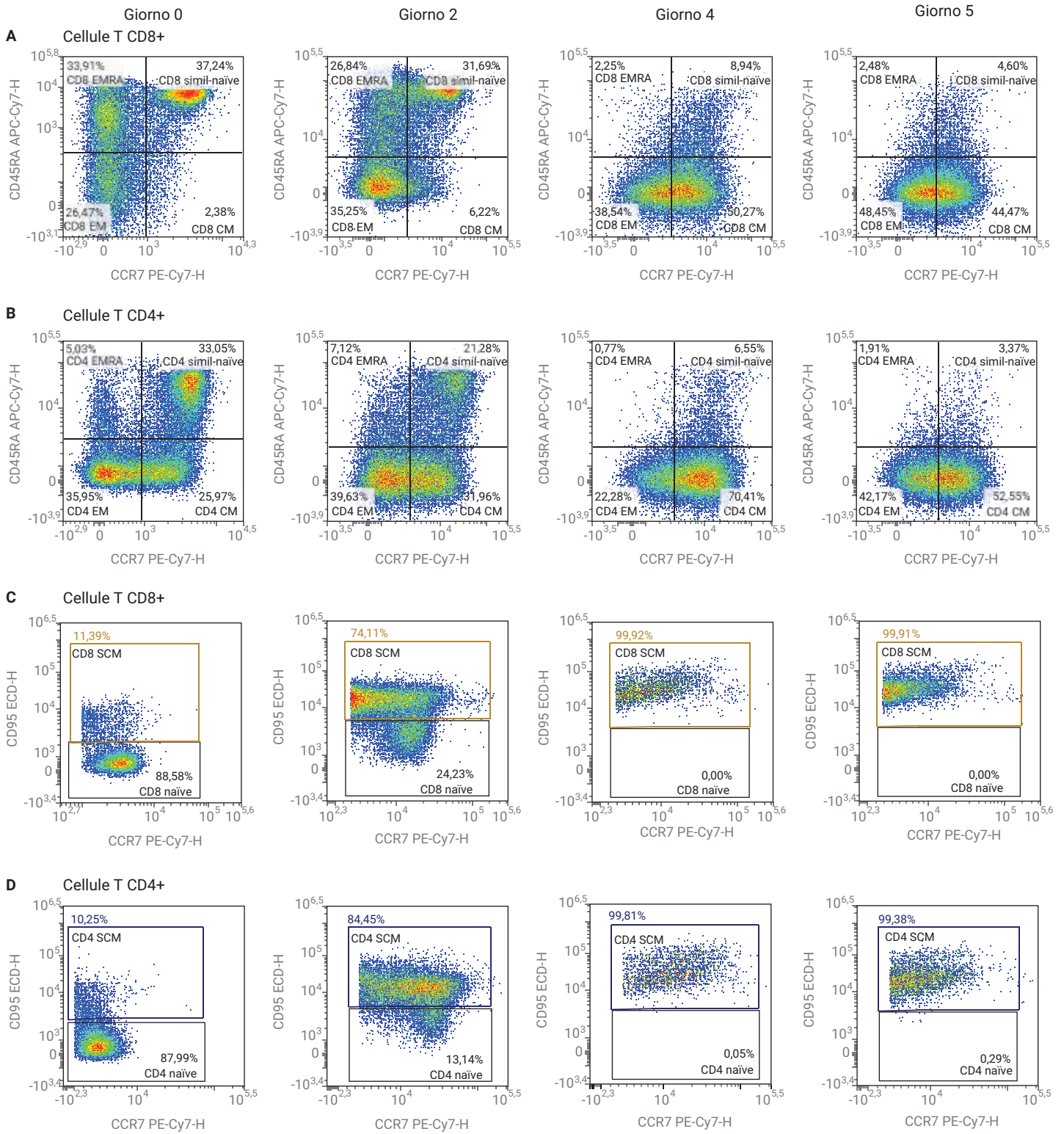


Figura 2. Le variazioni cinetiche di sottoinsiemi di cellule T sono continue. PBMC isolate da sangue di donatori sono state stimolate con 5 µg/mL di anticorpo anti-CD3, 2 µg/mL di anticorpo anti-CD28 e 100 ng/mL di IL-2. Le PBMC stimolate sono state colorate con il pannello di immunofenotipizzazione a 16 colori (Tabella 1) nei giorni 0, 2 e 4. Le cellule sono state ristimate il giorno 4 e analizzate 24 ore più tardi (giorno 5). L'espressione di CCR7 e CD45RA è stata analizzata in ogni punto temporale per le cellule T CD8 (A) e CD4 (B) per determinare la variazione relativa dei sottoinsiemi di cellule T simil-naive, memoria centrale (CM), memoria effettrice (EM) ed RA di memoria effettrice (EMRA). Le cellule T simil-naive CD8 e CD4 sono state ulteriormente analizzate relativamente all'espressione di CD95 per distinguere le cellule staminali di memoria (SCM) dalle vere cellule T naive. La proporzione di cellule T CD4+, CD8+ e T_{SCM} , T_{CM} , T_{EM} , T_{EMRA} e T_{naive} è variata nel tempo.

Up-regulation progressiva del recettore inibitorio in seguito a stimolazione del TCR

La stimolazione persistente incrementa l'espressione dei recettori inibitori ed è un indicatore chiave dell'esaurimento delle cellule T. La regolazione negativa efficiente da parte dei recettori inibitori è di ausilio nel limitare le risposte immunitarie eccessivamente esuberanti. I recettori inibitori, tuttavia, possono anche ostacolare l'efficacia delle risposte immunitarie mirate a eliminare patogeni e tumori. Determinare come avviene l'up-regulation dei recettori inibitori durante la stimolazione persistente e acuta delle cellule T è fondamentale per la manipolazione terapeutica più sicura ed efficace di queste vie.

I marker di attivazione (CD25 e CD127) e i recettori inibitori (PD-1, LAG-3 e TIM-3) sono stati esaminati ai giorni zero, due e quattro e dopo ristimolazione al giorno cinque (Figura 3). Il CD25 è stato rapidamente up-regolato mentre il CD127 down-regolato sia nelle cellule T CD8 sia CD4, a dimostrazione della rapida attivazione delle cellule T. Non è stata osservata un'immediata variazione nell'espressione dei recettori inibitori dopo due giorni di stimolazione. Tuttavia, dopo quattro giorni di stimolazione, PD-1, LAG-3 e TIM-3 sono stati up-regolati in entrambe le popolazioni di cellule T CD4 e CD8. Dopo ristimolazione al giorno 5 con anti-CD3/CD28, tutti i recettori inibitori sono stati down-

regolati. Ciò è coinciso con una riduzione dell'espressione di CCR7 e una riduzione nella percentuale di cellule T_{CM} dopo la ristimolazione. Nel corso della transizione delle cellule T verso un fenotipo effettore, è vantaggioso ridurre l'espressione dei recettori inibitori. Ciò si correla a studi precedenti che suggeriscono che l'esaurimento delle cellule T ha luogo mentre le cellule passano a un fenotipo di memoria, nonostante la persistenza dell'antigene. L'esame dell'espressione dei recettori inibitori nel contesto di vari fenotipi e funzioni delle cellule T permette di comprendere come le cellule T vengono modificate nel quadro di una risposta immunitaria.

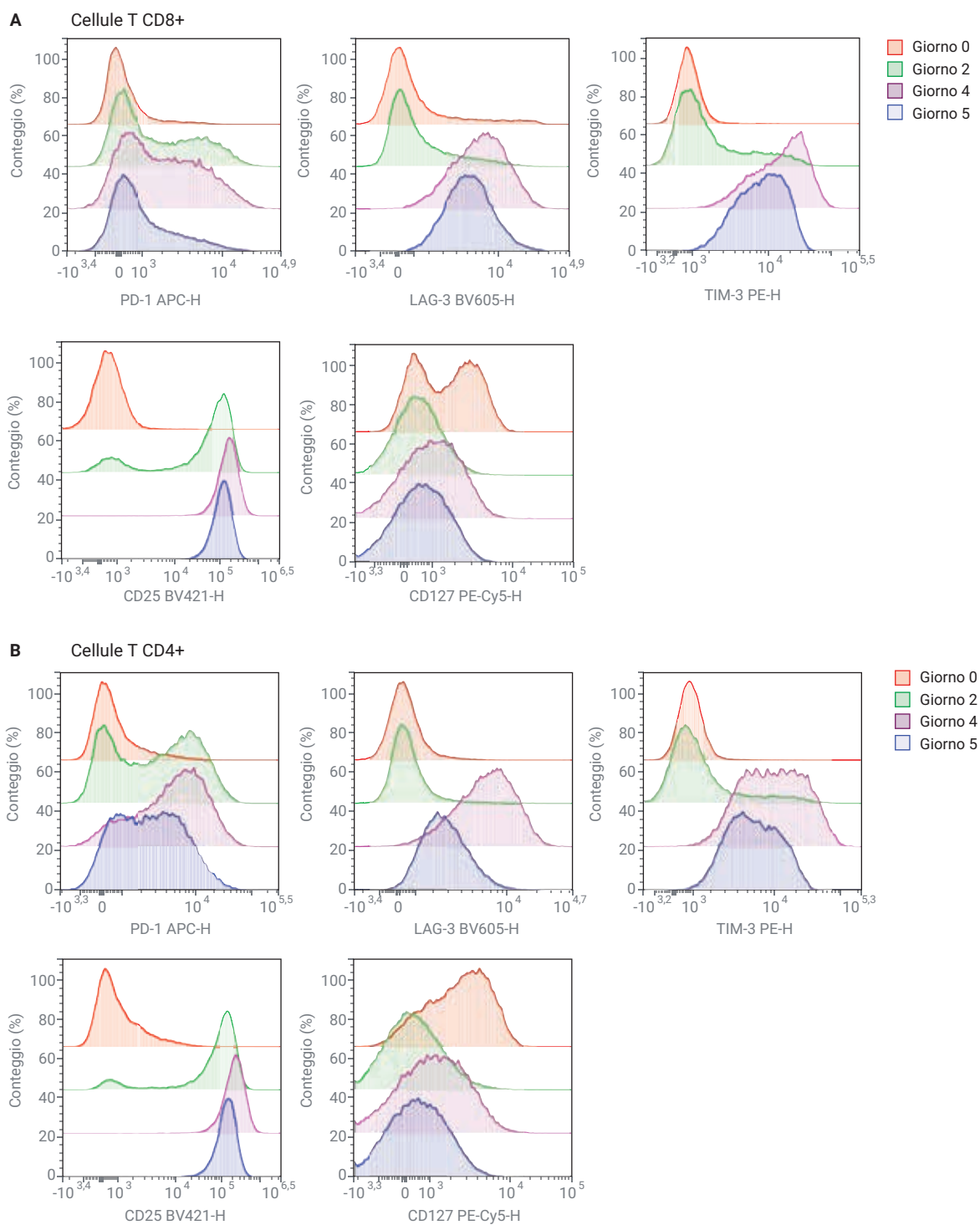


Figura 3. Variazione del livello di espressione di recettori inibitori e di attivazione in seguito a stimolazione. PBMC isolate da sangue di donatori sono state stimolate con 5 µg/mL di anticorpo anti-CD3, 2 µg/mL di anticorpo anti-CD28 e 100 ng/mL di IL-2. Le PBMC stimolate sono state colorate con il pannello di immunofenotipizzazione a 16 colori (Tabella 1) nei giorni 0, 2 e 4. Le cellule sono state ristimate il giorno 4 e analizzate 24 ore più tardi (giorno 5). Sono stati analizzati nel tempo i recettori inibitori PD-1, LAG-3 e TIM-3 e i marker di attivazione CD25 e CD127.

Conclusione

L'analisi esaustiva delle cellule T offre una visione più approfondita della risposta di tali cellule mediante l'esame simultaneo della differenziazione, dell'attivazione, della produzione di citochine e della degranolazione, permettendo di ottenere una comprensione più completa delle cellule T. Il sistema NovoCyte Advanteon con il pannello di immunofenotipizzazione a 16 colori è di ausilio nel delucidare ulteriormente la risposta delle cellule T nel contesto dell'infezione persistente e dell'immunità tumorale.

Bibliografia

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4889009/>
2. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0177405>
3. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201343751>
4. <https://www.jimmunol.org/content/188/7/2957>
5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4481276/>
6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01215/full>
7. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cyto.a.22938>

www.agilent.com/chem

Solo per scopi di ricerca. Non utilizzabile per procedure diagnostiche.

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Stampato negli Stati Uniti, 9 ottobre 2019
5994-1455ITE