

# Комплексный анализ состояния Т-клеток после их активации с использованием 16-цветной панели иммунофенотипирования на проточном цитометре NovoCyte Advanteon

## Авторы

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

## Аннотация

Т-клетки вносят существенный вклад в иммунный ответ и способны распознавать и устранять чужеродные патогены и опухолевые клетки. Однако при этом необходим тщательный контроль за Т-клеточной иммунной реакцией, чтобы не допускать аутоиммунных проявлений и иммунопатологии. 16-цветная панель иммунофенотипирования Т-клеток была разработана для проточного цитометра Agilent NovoCyte Advanteon с целью проведения одновременного анализа Т-клеточной дифференцировки, активации, истощения и функционального выхода посредством дегрануляции и экспрессии цитокинов. Теоретически этот метод дает возможность проведения полного и всестороннего анализа функций Т-клеток в процессе иммунного ответа.

## Введение

Роль иммунной системы состоит в том, чтобы бороться с патогенами, ограничивая при этом различные аутоиммунные проявления. Т-клетки играют важную роль в адаптивном иммунном ответе и способны к специфическому распознаванию антигенов и устранению инфекций. При нормальном иммунном ответе Т-клетки активируются, чтобы начать быстро делиться и разрушать все инфицированные или раковые клетки. Активация посредством Т-клеточного рецептора (TCR) и ко-стимулирующих рецепторов должна балансироваться действием ингибиторных (супрессорных) рецепторов, таких как белок запрограммированной смерти клеток 1 (PD-1), ген активации лимфоцитов 3 (LAG-3) и белок, содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и муциновый домен-3 (TIM-3). Это необходимо для предотвращения развития аутоиммунных реакций и иммунопатологии.

При продолжительном стимулировании Т-клеток происходит прогрессивный рост экспрессии ингибиторных рецепторов и снижение эффекторной функции Т-клеток, а также их пролиферативного потенциала (истощение Т-клеток). Это можно наблюдать при хронической инфекции или раке. Ингибиторные рецепторы стали объектом различных иммунотерапевтических исследований в области раковых заболеваний, поскольку обращение экспрессии ингибиторного рецептора за счет блокирования ингибитора контрольных точек восстанавливает функцию Т-клеток и улучшает противоопухолевый иммунитет в клинических условиях. Степень истощения Т-клеток сильно коррелирует с коэкспрессией сразу нескольких ингибиторных рецепторов, что делает перспективным комбинированное лечение, поскольку его целью становятся сразу несколько ингибиторных рецепторов, а это обеспечивает более высокий рост противоопухолевого иммунитета. Анализ одной только экспрессии ингибиторных рецепторов Т-клеток сам по себе не обеспечивает комплексного взгляда на состояние Т-клеток. Измерение дополнительных маркеров, отвечающих за дифференцировку, активацию, предшествующую антигенную стимуляцию, дегрануляцию Т-клеток и выработку цитокинов, дает более всеобъемлющее понимание вопроса.

В исследованиях были идентифицированы внутренние различия в экспрессии ингибиторных рецепторов среди различных субпопуляций Т-клеток (наивных, эффекторных и клеток памяти). 16-цветная панель иммунофенотипирования была произведена для работы на проточном цитометре NovoCyte Advanteon (см. таблицу 1) с целью исследования дифференцировки Т-клеток CD4 и CD8, их активационного состояния и измерения Т-клеточных функциональных ответов. Используя широкие возможности цитометра NovoCyte Advanteon в области многопараметрического анализа, на основании этих данных был продемонстрирован всесторонний комплексный взгляд на кинетические изменения, происходящие в субпопуляциях Т-клеток и их функция после стимулирования.

### Исчерпывающий анализ состояния Т-клеток после стимулирования Т-клеточных рецепторов (TCR)

Для наиболее полного исследования реакции Т-клеток на активацию TCR мы рассмотрели дифференцировку, активацию, ингибиторные маркеры, а также дегрануляцию и выработку цитокинов в Т-клетках CD4 и CD8 (см. таблицу 1). Выделенные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) стимулировали

антителами anti-CD3, anti-CD28 и интерлейкином-2 (IL-2), чтобы вызвать активацию Т-клеток. За шесть часов до анализа на проточном цитометре секреция цитокинов был заблокирована с помощью ингибитора транспортных белков. Образцы измерялись сначала через два и четыре дня в культуре, а затем еще раз на 5-й день после рестимуляции.

На рисунке 1 продемонстрирована характерная стратегия выбора областей анализа (гейтинга) для образца 4-го дня. Прежде всего, с помощью критерия оценки жизнеспособности исключались мертвые клетки, после чего оценивалась частота обнаружения Т-клеток CD4 и CD8 внутри общей популяции Т-клеток CD3. Далее оценивалась дифференцировка Т-клеток, для чего определялась относительная частота проявлений субпопуляций Т-клеток, исходя из поверхностной экспрессии CD45RA и CCR7. Т-клетки подразделяются на наивно-подобные клетки  $T_{naive-like}$  (CD45RA+/CCR7+), центральные клетки памяти  $T_{CM}$  (CD45RA-/CCR7+), эффекторные клетки памяти  $T_{EM}$  (CD45RA-/CCR7-) и клетки памяти с CD45RA+ эффектором  $T_{EMRA}$  (CD45RA+/CCR7+). Кроме того, наивно-подобные клетки  $T_{naive-like}$  подразделялись на истинные ( $T_{naive}$ ) и Т-стволовые клетки памяти ( $T_{SCM}$ ) посредством экспрессии CD95 на  $T_{SCM}$ .

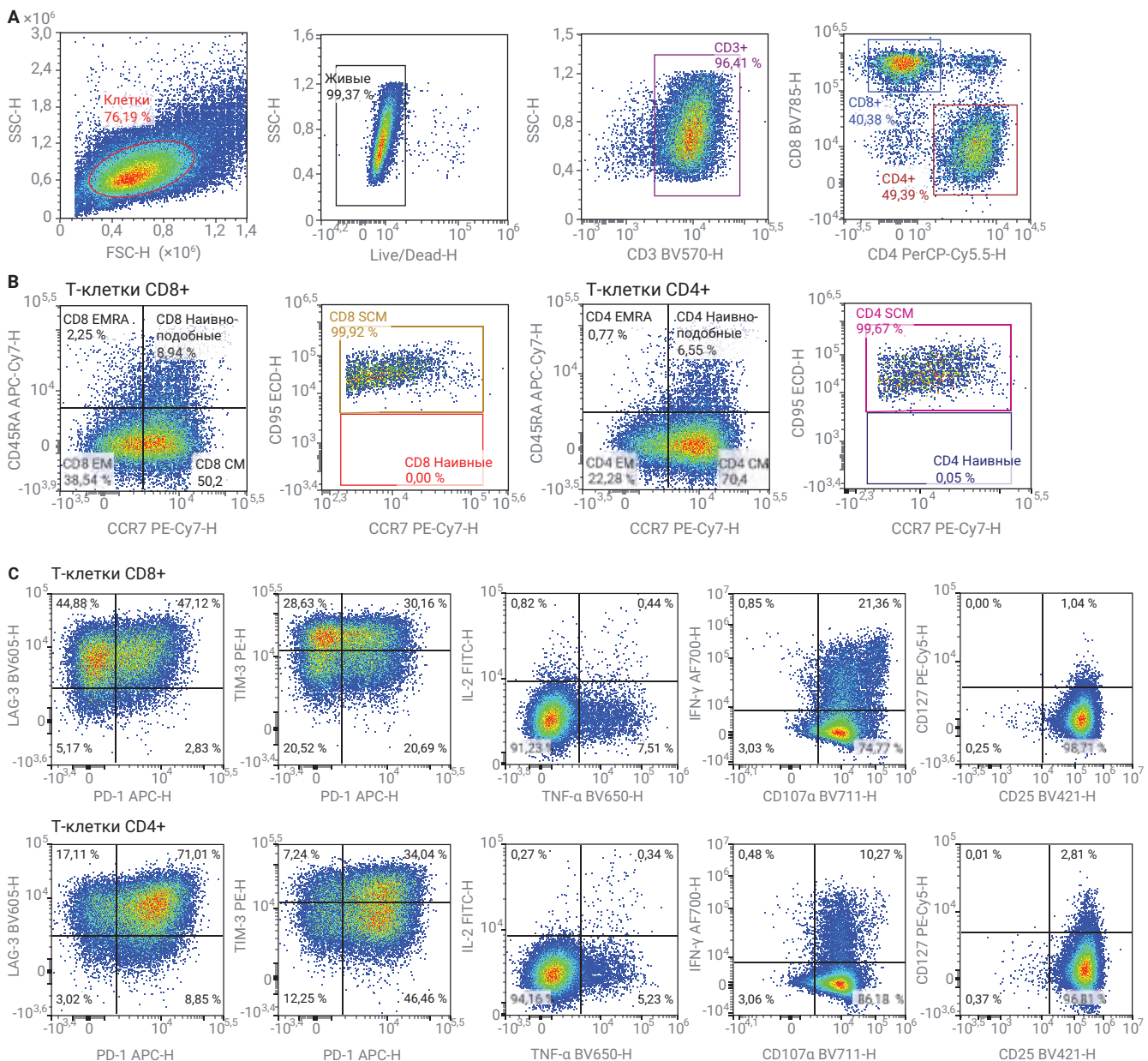
Таблица 1. Флуорохромы, используемые в 16-цветной панели иммунофенотипирования

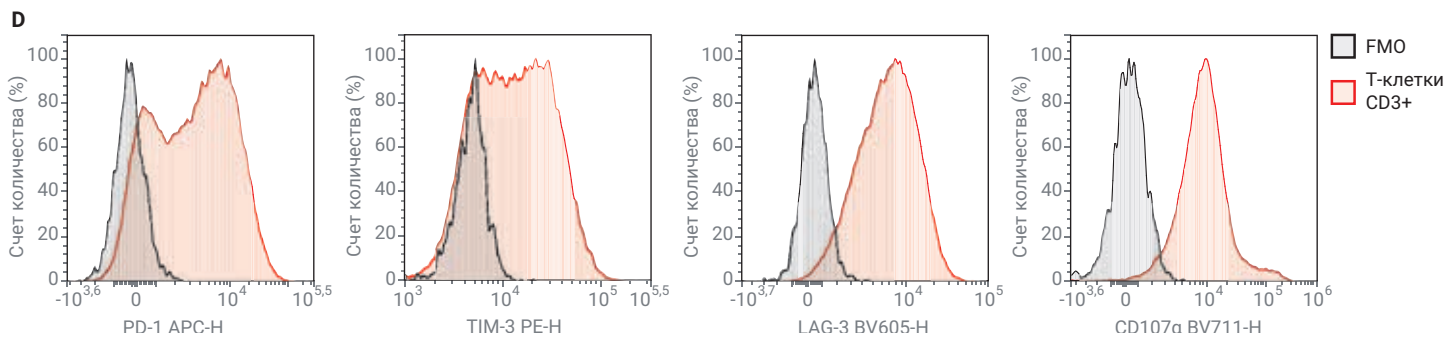
Маркер	Флуорохром	Клон	Цель
Live/Dead	AVID		Жизнеспособность
CD3	BV570	UCHL1	Линия дифференцирования
CD4	PerCP-Cy5.5	RPA-T4	
CD8	BV785	SK1	
CD45RA	APC-Cy7	HI100	Активация/ дифференцировка
CCR7	PE-Cy7	G043H7	
CD25	BV421	M-A251	
CD127	PE-Cy5	A019D5	
CD95	PE-Dazzle594	DX2	
PD-1	APC	EH12.2H7	Ингибиторные рецепторы
TIM-3	PE	F38-2E2	
LAG-3	BV605	11C3C65	
IL-2	FITC	MQ1-17H12	Цитокины
IFN- $\gamma$	AF700	B27	
TNF- $\alpha$	BV650	MAb11	
CD107 $\alpha$	BV711	H4A3	
			Дегрануляция

Далее исследовалась экспрессия ингибиторных рецепторов PD-1, TIM-3 и LAG-3, а также маркеров активации CD25 и CD127. Эти маркеры предоставляют дополнительную информацию об активационном состоянии Т-клеток. И наконец, измерялась выработка цитокинов IL-2, фактора некроза опухолей альфа (TNF $\alpha$ ) и интерферона гамма (IFN $\gamma$ ), а также определялась степень дегрануляции посредством экспрессии CD107 $\alpha$ , которая разграничивает цитолитические Т-клетки. Все гейты определялись путем использования контроля по флуоресценции с комбинацией

детектируемых меток без одной (Fluorescence Minus One – FMO) (рисунок 1D). Через четыре дня после стимулирования большинство клеток претерпевают Т-клеточную активацию, и они больше не являются наивными Т<sub>naive</sub> клетками, как в популяциях Т-клеток CD4, так и в популяциях CD8. В Т-клетках наблюдалась большая повышенная регуляция экспрессии CD25 и пониженная регуляция CD127, что также указывает на высокую активацию Т-клеток. Независимо от того, относились они к CD4 или к CD8, Т-клетки имели экспрессию ингибиторного рецептора с повышенной регуляцией, хотя не

все клетки имели положительную экспрессию. Выработка цитокинов TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  также имела место, тогда как выработка IL-2 была лишь самой минимальной. Большинство Т-клеток были также положительными по CD107 $\alpha$ , показывая наличие цитолитического потенциала. Эта многопараметрическая окрашивающая панель при ее использовании с проточным цитометром NovoCyte Advanteon позволяет проводить обширный анализ Т-клеток после их стимулирования. Далее исследовались кинетические изменения в измеренных параметрах Т-клеток после их активации TCR.





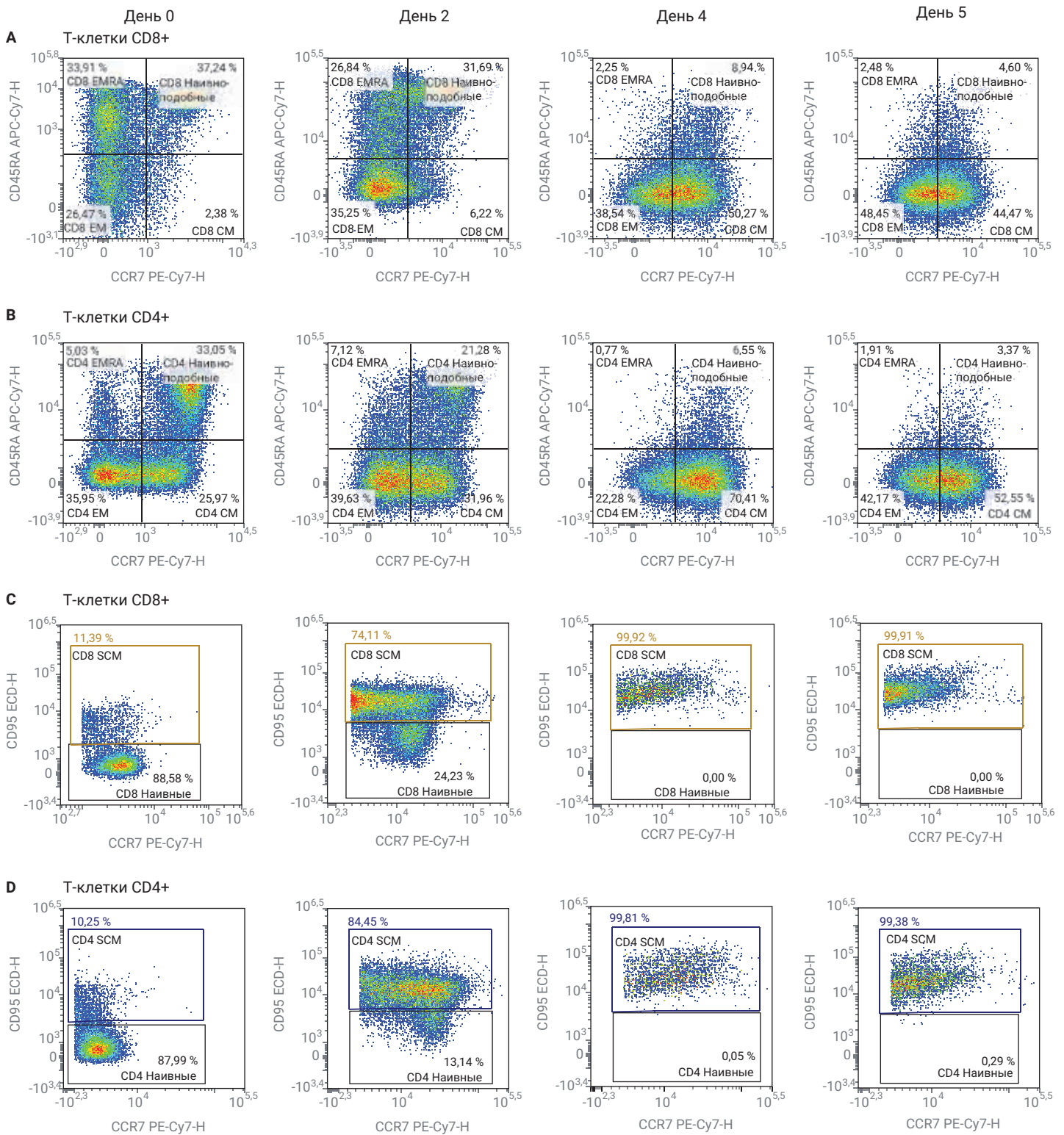
**Рисунок 1.** Иммунофенотипирование стимулированных клеток PBMC с помощью 16-цветной панели проточной цитометрии. Клетки PBMC, выделенные из донорской крови, стимулировали посредством антител anti-CD3 в концентрации 5 мкг/мл, антител anti-CD28 в концентрации 2 мкг/мл и IL-2 в концентрации 100 нг/мл. Стимулированные клетки PBMC окрашивали посредством 16-цветной панели иммунофенотипирования (таблица 1) в день 4. За шесть часов до проведения анализа непосредственно в лунки панели добавляли смешанный раствор ингибиторов транспорта белков (по 2 мкл на лунку) и раствор антитела anti-CD107a BV711 (5 мкл на лунку). (A) Стратегия гейтирования. FSC-H и SSC-H использовали для идентификации целевых клеток на фоне клеточных остатков (дебриса); мертвые клетки исключали посредством красителя Live/Dead. Для идентификации T-клеток использовали CD3. Последующее гейтирование клеток CD3+ позволило идентифицировать T-клетки CD4+ и CD8+. Когда гейтирование проводилось на клетках CD4+ или CD8+, идентифицировали клетки  $T_{CM}$ ,  $T_{EM}$  и  $T_{EMRA}$ , для чего исходили из различий в экспрессии CD45RA и CCR7. В популяции CD45RA+CCR7+ в дальнейшем были выявлены CD95+ TSCM и CD95- наивные T-клетки (B). В T-клеточных субпопуляциях CD4+ и CD8+ также исследовали уровень экспрессии CD25 и CD127, уровень истощения PD-1, LAG-3 и TIM-3, уровень секреции цитокинов IL-2, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  и уровень дегрануляции CD107a. Показанные здесь данные были получены для образца, отобранного в день 4. (D) Контрольные испытания по FMO. Гейты определяли путем использования контрольных тестов FMO. Выше показаны результаты контрольных тестов FMO для PD-1, TIM-3, LAG-3 и CD107a. Образцы получали на проточном цитометре Agilent NovoCyte Advanteon и анализировали с помощью программного обеспечения NovoExpress.

### Непрерывные изменения, происходящие в дифференцировочном состоянии T-клеток после стимулирования

Активация TCR вызывает быстрые изменения в T-клеточной дифференцировке. Дифференцировочный статус исследовали путем идентификации каждой субпопуляции, а именно:  $T_{naive}$ ,  $T_{SCM}$ ,  $T_{CM}$ ,  $T_{EM}$  и  $T_{EMRA}$  — как это описано в предыдущем разделе. Предыдущие исследования выявили функциональные различия между субпопуляциями T-клеток;  $T_{naive}$  и  $T_{SCM}$  имеют высокий пролиферативный потенциал, но не имеют быстрой эффекторной функции, тогда как  $T_{EM}$  и  $T_{EMRA}$  обладают меньшим

пролиферативным потенциалом, но имеют более обширные эффекторные возможности.  $T_{SCM}$  испытывают антигенную стимуляцию, но при этом сохраняют те же аналогичные стволовым клеткам свойства самообновления, как и наивные  $T_{naive}$  клетки. Для понимания изменений в T-клеточной дифференцировке, происходящих после стимулирования, исследовали относительные частотности проявлений всех субпопуляций T-клеток в нестимулированных и стимулированных клетках крови PBMC через два и четыре дня, а также в рестимулированных PBMC на 5-й день (см. рисунок 2). Как и ожидалось, частотность проявлений наивных  $T_{naive}$  клеток резко снижалась

после двух дней стимуляции TCR; большинство клеток CD45RA+ CCR7+ составили  $T_{SCM}$ , поскольку они также экспрессируют CD95 (см. рисунок 2B). Такая картина типична при активации *ex vivo* антителами anti-CD3/anti-CD28, поскольку они активируют все присутствующие T-клетки. Доля  $T_{SCM}$  устойчиво повышается со временем после стимуляции, однако после рестимуляции (в образце 5-го дня) доля  $T_{SCM}$  снижается. Это говорит о том, что рестимуляция вызывает сдвиг в популяции T-клеток в сторону эффекторного фенотипа. В целом стимуляция *ex vivo* клеток PBMC вызывает быструю дифференцировку популяции T-клеток в сторону множественных субпопуляций эффекторных клеток и клеток памяти.



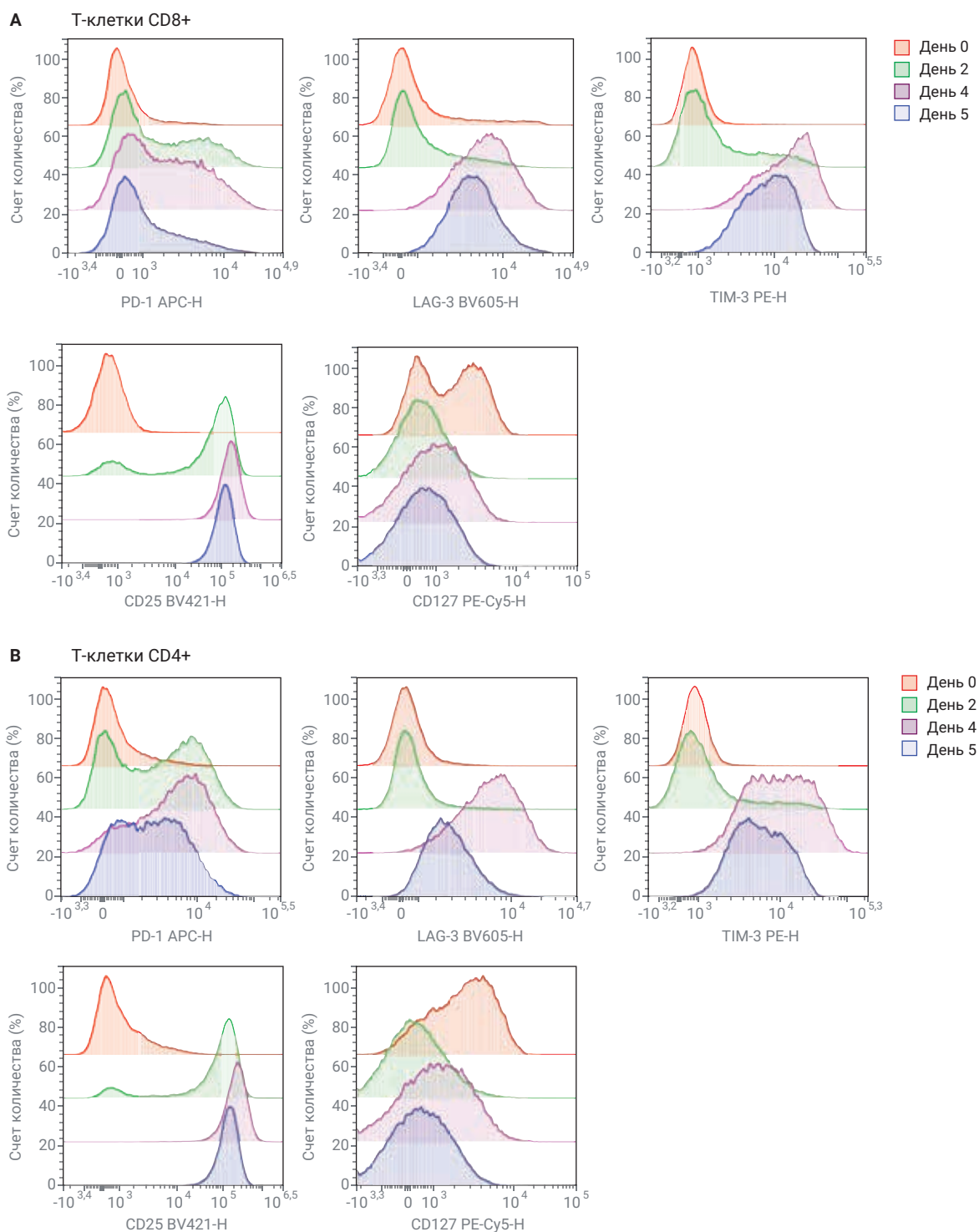
**Рисунок 2.** Кинетические изменения в субпопуляциях Т-клеток непрерывны. Клетки РВМС, выделенные из донорской крови, стимулировали посредством антител anti-CD3 в концентрации 5 мкг/мл, антител anti-CD28 в концентрации 2 мкг/мл и IL-2 в концентрации 100 нг/мл. Стимулированные клетки РВМС окрашивали посредством 16-цветной панели иммунофенотипирования (таблица 1) в дни 0, 2 и 4. Клетки рестимулировали в день 4 и анализировали через 24 часа (в день 5). Экспрессию CCR7 и CD45RA анализировали в каждой временной точке для Т-клеток CD8 (А) и Т-клеток CD4 (В), чтобы определить относительное изменение субпопуляций Т-клеток, таких как наивно-подобные клетки, центральные клетки памяти (СМ), эффекторные клетки памяти (ЕМ) и эффекторные клетки памяти (EMRA). Наивно-подобные Т-клетки CD8 и CD4 анализировали далее на экспрессию CD95, чтобы различить клетки памяти стволовых клеток (SCM) и истинно наивные Т-клетки. Доли Т-клеток CD4+, CD8+ и клеток  $T_{SCM}$ ,  $T_{CM}$ ,  $T_{EM}$ ,  $T_{EMRA}$  и  $T_{naive}$  изменялись со временем.

### **Нарастающая повышенная регуляция ингибиторного рецептора после стимуляции TCR**

При устойчивой стимуляции экспрессия ингибиторного рецептора возрастает, и это является ключевым показателем истощения Т-клеток. Эффективная отрицательная регуляция ингибиторными рецепторами помогает ограничивать гиперчувствительные иммунные ответы. Однако ингибиторные рецепторы могут также создавать помехи для эффективных иммунных ответов по выявлению патогенов и опухолей. Определение ингибиторных рецепторов в ходе острой и устойчивой стимуляции Т-клеток, очень важно для выработки наиболее безопасных и максимально эффективных терапевтических процедур в этих направлениях.

Активационные маркеры (CD25 и CD127) и ингибиторные рецепторы (PD-1, LAG-3 и TIM-3) исследовались в нулевой, второй и четвертый день, а также после рестимуляции на пятый день (см. рисунок 3). CD25 показывали быструю повышающую регуляцию, тогда как CD127 показывали понижающую регуляцию в Т-клетках CD8 и CD4, демонстрируя быструю активацию Т-клеток. После двух дней стимуляции никаких непосредственных изменений в экспрессии ингибиторных рецепторов не наблюдалось. Однако после четырех дней стимуляции наблюдалась повышенная регуляция PD-1, LAG-3 и TIM-3, причем как в популяциях Т-клеток CD4, так и в популяциях CD8. После рестимуляции в день 5 с помощью антител anti-CD3/CD28 все

ингибиторные рецепторы претерпевали понижающую регуляцию. Этот факт согласовывался с фактом понижения экспрессии CCR7 и уменьшения процента клеток  $T_{CM}$  после рестимуляции. Как и переход Т-клеток в направлении эффекторного фенотипа, это благоприятствует снижению экспрессии ингибиторного рецептора. Эти данные коррелируют с предыдущими исследованиями, в ходе которых предполагалось, что истощение Т-клеток происходит из-за того, что клетки переходят к фенотипу клеток памяти, несмотря на постоянное присутствие антигена. Исследование экспрессии ингибиторного рецептора в контексте различных фенотипов и функций Т-клеток дает понимание того, как изменяются Т-клетки в ходе иммунного ответа.



**Рисунок 3.** Изменение экспрессии ингибиторных и активационных рецепторов после стимуляции. Клетки PBMC, выделенные из донорской крови, стимулировали посредством антител anti-CD3 в концентрации 5 мкг/мл, антител anti-CD28 в концентрации 2 мкг/мл и IL-2 в концентрации 100 нг/мл. Стимулированные клетки PBMC окрашивали посредством 16-цветной панели иммунофенотипирования (таблица 1) в дни 0, 2 и 4. Клетки рестимулировали в день 4 и анализировали через 24 часа (в день 5). Ингибиторные рецепторы PD-1, LAG-3 и TIM-3 и маркеры активации CD25 и CD127 анализировали на изменение во времени.

## Выводы

Тщательный анализ Т-клеток позволяет более точно оценить Т-клеточный иммунный ответ за счет исследования одновременно их дифференцировки, активации, выработки цитокинов и дегрануляции, благодаря чему, можно прийти к более всестороннему пониманию природы и функций Т-клеток. Использование проточного цитометра NovoCyte Advanteon для работы с этой 16-цветной панелью фенотипирования может помочь в дальнейшем прояснении ответа Т-клеток в ходе выработки иммунитета к устойчивым инфекциям и опухолям.

## Литература

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](http://www.agilent.com/chem)

Только для научно-исследовательских целей.  
Не для использования в диагностических процедурах.

Информация в этом документе может быть изменена без уведомления.

© Agilent Technologies, Inc., 2019  
Напечатано в США 6 декабря 2019 г.  
5994-1455RU