

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

Институт биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

На правах рукописи

ЧКАЛИНА АННА ВАЛЕРЬЕВНА

**Изучение генетической variability Т-лимфоцитов и
характеристика патологических клонов
при аутоиммунных заболеваниях**

Специальность 03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва – 2012

Работа выполнена в лаборатории сравнительной и функциональной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель: д. б. н. Юрий Борисович Лебедев

Официальные оппоненты: чл.-корр. РАН, д.б.н. , профессор
Сергей Михайлович Деев

Ведущий научный сотрудник Центра
«Биоинженерия» РАН, к.б.н.

Михаил Анатольевич Эльдаров

Ведущая организация: **Центральный НИИ туберкулеза РАМН**

Защита состоится «18» апреля 2012 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, г. Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая 16/10.

С текстом диссертации можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Автореферат разослан «___» _____ 2012 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
доктор физ.-мат. наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В настоящее время аутоиммунные заболевания относятся к числу основных медицинских проблем, требующих внимания. На данный момент известно более 80 различных аутоиммунных заболеваний человека. Причиной аутоиммунных заболеваний являются нарушения функционирования иммунной системы, в результате которых клетки иммунной системы атакуют органы и ткани собственного организма. Для ряда аутоиммунных состояний есть основания предполагать, что причиной развития может являться клональная экспансия аутореактивных Т-клеток. К таким заболеваниям относятся различного рода артриты, диабет I типа, рассеянный склероз.

Одним из аутоиммунных заболеваний, относящихся к группе артритов, является анкилозирующий спондилит (АС, болезнь Бехтерева, заболевание Штрumpfелля-Мари). Генетические причины возникновения и развития этого заболевания окончательно не выяснены. По современным представлениям его можно отнести к мультигенным заболеваниям, так как показана корреляция между присутствием в геноме ряда аллельных вариантов генов с повышенным риском развития АС. Учитывая жесткую сцепленность риска развития АС с одним из HLA-B аллелей, кодирующим вариант молекулы МНС-I типа, в настоящее время предполагается активное участие Т-клеток в развитии заболевания. Существующие гипотетические модели развития АС предполагают вклад в развитие заболевания различных типов взаимодействия внешних и внутренних факторов, так как наследуемость АС не является 100% среди монозиготных близнецов, подразумевая вклад факторов окружающей среды. В настоящий момент считается, что определяющим этапом и характеристическим признаком развития АС является изменение репертуара Т-лимфоцитов.

Данная работа посвящена изучению репертуара Т-лимфоцитов у больных АС, проведению систематического долговременного анализа и выявлению случаев Т-клеточной клональной экспансии, а также определению характеристик предположительно патогенных Т-клонов.

Выявление и характеристика клональной экспансии Т-лимфоцитов у больных АС, изучение динамики клонов Т-клеток в ходе заболевания вносят вклад в понимание механизмов возникновения аутоиммунных заболеваний в целом. Также полученные данные о патогенных клонах Т-клеток при АС могут быть использованы для разработки средств терапии, профилактики и методов ранней диагностики.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы являлось выявление клональной экспансии Т-лимфоцитов, характеристика и долговременный мониторинг патогенных клонов при анкилозирующем спондилите.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие экспериментальные задачи:

- 1) Получение ранжированных клонотек кДНК β -цепей ТкР
- 2) Масштабное секвенирование и анализ нуклеотидной последовательностей зрелых генов β -цепей ТкР
- 3) Характеристика высокопредставленных клонов Т-лимфоцитов.
- 4) Количественная оценка клональной экспансии
- 5) Изучение стабильности олигоклональной экспансии во времени

Научная новизна и практическая значимость работы

Работа была выполнена в рамках проекта «Комплексное изучение молекулярно-генетических причин нарушений толерантности Т-клеток иммунной системы организма человека при аутоиммунных заболеваниях». Данная работа посвящена идентификации предположительно патогенных клонов Т-лимфоцитов у больных анкилозирующим спондилитом.

По результатам настоящей работы предложен подход к систематическому анализу репертуара периферических Т-лимфоцитов и мониторингу клональной экспансии Т-клеток у больных АС. Такой подход позволяет не только выявлять выраженную экспансию индивидуальных клонов Т-лимфоцитов, но и изучать динамику изменения репертуара Т-клеток при аутоиммунных заболеваниях. Подход также применим для функциональной характеристики перепредставленных клонов Т-лимфоцитов

Впервые был проведен систематический анализ Т-клеточной клональной экспансии при аутоиммунном заболевании, заключающийся в выявлении и количественной оценке клональной экспансии на протяжении длительного периода времени. Разработанный нами подход позволил охарактеризовать выявленные Т-клоны по ряду маркеров, характеризующих функционально различные субпопуляции Т-лимфоцитов, без искажения результатов, вызываемого культивированием *in vitro*.

Одним из основных результатов стало выявление стабильной Т-клеточной экспансии нескольких клонов. В том числе, обнаружен сложный клонотип включающий клоны, происходящие от нескольких предшественников, но экспрессирующие сходные по строению зрелые гены Т-клеточного рецептора с высокомолекулярными антигенраспознающими

(CDR3)-доменами. Полученные результаты существенно расширяют современные представления о молекулярных и клеточных механизмах развития и течения анкилозирующего спондилита.

Выявленные патогенные клоны могут служить маркерами заболевания и в дальнейшем мишенями для специфической терапии в клинической практике. Разработанный подход можно использовать при различных нарушениях функционирования иммунной системы, при которых наблюдается Т-клеточная клональная экспансия.

Апробация работы и публикации

Результаты работы представлялись на отечественных и международных конференциях, в том числе на XXI зимней молодежной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2009), 15th International Summer School on Immunology "IMMUNE SYSTEM: GENES, RECEPTORS AND REGULATION" (Hvar, Croatia, 2009), 4th ESF Conference on functional genomics and disease, Dresden, Germany, 2010), 14th International congress on immunology (Kobe, Japan, 2010), European Human Genetics Conference 2011 (Amsterdam, The Netherlands, 2011), 36th FEBS Congress (Torino, Italy, 2011).

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ в российских и зарубежных журналах.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на ____ страницах, содержит ____ рисунков и ____ таблиц; состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и библиографического списка, включающего ____ источников.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Получение библиотек β -цепей – клонотек β -цепей.

В ходе работы основное внимание было направлено на исследование разнообразия зрелых генов β -цепей содержащих вариабельные части (V-гены) 25 наиболее представленных, по литературным данным, в пуле зрелых генов ТкР семейств V-генов. Для выполнения данной задачи была разработана система праймеров, позволяющих специфически амплифицировать зрелые гены ТкР отдельных V-семейств.

Для изучения клонального разнообразия ТкР и мониторинга клональной экспансии Т-клеток периферической крови у больных АС нами был разработан подход, заключающийся в масштабном секвенировании, включающем гипервариабельный участок зрелых генов β -цепи ТкР (CDR3). Участок CDR3 образуется в ходе рекомбинации различных V-генов и фрагментов D и J и в основном обеспечивает специфичность ТкР к антигену.

Для получения клонотек β -цепей ТкР были использованы образцы периферической крови двух *HLA-B*27*-положительных пациентов с подтвержденным клинически и рентгенологически диагнозом «анкилозирующий спондилит». На момент исследования возраст пациентов составлял по 45 лет. Первые проявления болезни были зафиксированы около 20 лет. Первому больному на протяжении последних 3 лет каждые 1.5 месяца проводилась терапия препаратом Ремикейт, второму больному терапия препаратом Ремикейт проводилась один раз.

Из образцов периферической крови больных была выделена моноклеарная фракция клеток с помощью центрифугирования в ступенчатом градиенте раствора фиколла. Из клеток моноклеарной фракции периферической крови был выделен образец тотальной РНК, содержащий транскрипты зрелого гена ТкР. Далее проводили синтез первых цепей кДНК с использованием праймера олигоТ. Полученные образцы первых цепей кДНК использовались для специфической амплификации, с праймерами комплементарными вариабельному участку β -цепи и константному региону, и получения библиотек ПЦР-продуктов, содержащих фрагменты последовательностей зрелых генов ТкР с определенными участками V-генов.. Схема получения ампликонов BV-семейств ТкР представлена на **рисунке 1**.

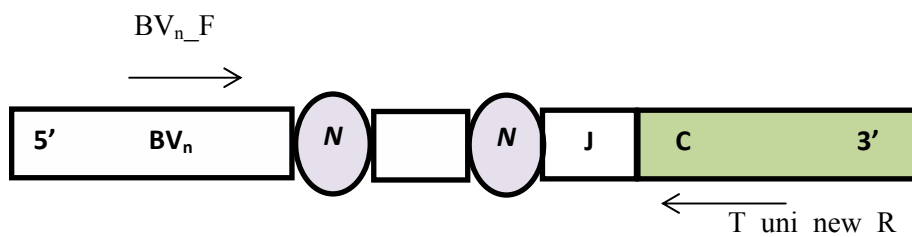


Рисунок 1. Схема получения ампликонов для BV-семейств ТкР. BV_n – переменная область гена ТкР; N – короткие нуклеотиды произвольного состава; D, J и C – D-, J-и константная область зрелого гена ТкР; горизонтальными стрелками обозначены расположение и ориентация праймеров, специфичных к переменной области BV_n семейств ТкР (праймеры BV_n_F) и константной области C (праймер T_uni_new_R).

Полученные ампликоны BV-семейств ТкР были клонированы в плазмидный вектор. После трансформации клеток *E. coli* были получены ранжированные библиотеки для 25 BV-семейств ТкР двух больных болезнью Бехтерева.

2. Секвенирование и анализ структуры β-цепей ТкР.

Первичная структура клонированных ПЦР фрагментов β-цепи ТкР была определена, в среднем, для 96 клонов каждой из 50 ранжированных BV-клонотек ТкР. В целом, получено по 2400 сиквенсов β-цепи ТкР для каждого пациента.

В результате количественного анализа состава клонотек β-цепей ТкР была выявлена множественная клональная экспансия Т-клеток у двух пациентов АС. Мы допускали, что экспансия Т-клеток присутствует только в тех BV-семействах ТкР, в которых было выявлено более 5% идентичных аминокислотных последовательностей CDR3 участков. Полученные данные отражены в таблице 1.

Всего было выявлено 22 примера клональной экспансии. У пациента SL клональная экспансия найдена для 17, а у AV для 4-х из 25 проанализированных BV-семейств. Представленность клонотипов варьируется от 3,3% до 38% от семейства. Наиболее представленный клон для пациента SL BV1-VAL – 38%, для пациента AV клон BV7-YTP – 17%.

Наряду с группами идентичных кДНК ТкР, характеризующих каждый из клонотипов, проведенный сравнительный структурный анализ позволил выявить шесть групп зрелых генов ТкР, которые обладают высокой степенью гомологии с клонотипом SL_BV2-DTG. Все шесть выявленных типов структуры ТкР предполагаемых клонов периферических Т-лимфоцитов обладают сходным строением – BV2-D(D1 или D2)-BJ2.7-BC. Отличия в общей структуре 6 типов зрелых генов ТкР заключаются в присутствии одного из двух возможных вариантов D района и наличии различных по числу и составу нуклеотидных оснований, которые встраиваются в процессе VDJ рекомбинации и фланкируют D участок зрелого гена.

Согласно результатам проведенного анализа, следует исключить существование общего предшественника у обнаруженных клонов Т-лимфоцитов.

Таблица 1. Структура CDR3 и представленность основных Т-клонотипов.

	Семейство β-цепи ТкР	Название клона	Аминокислотная последовательность участка CDR3 ТкР выявленных Т клонов	%*
Пациент SL	BV1	BV1-VAL	LYFCASSVALGLNQEYFGP	38
	BV2	BV2-DTG	YICSARGDTGTGYEQYFGPG	10
	BV3	BV3-ETG	LCASKSLETGFNQPQHFGDG	3.8
	BV4	BV4-VRG	SSIYLCVSRGSEDTQYFGPG	9.3
	BV5	BV5-DSR	LYLCASSSGADSRTQYFGPG	4.9
	BV6	BV6-GVT	YLCASSGGVTGELFFGEGSR	3.7
	BV7	BV7-TTG	LYLCASSPTTGTIANYG YTF	11
	BV8	BV8-VAG	YFCASRVAGARGNEQFFGPG	5
	BV9	BV9-GLG	YFCASAGLGPDPKRPSTSGQ	4.6
	BV10	BV10-RWD	FCASSKARWDF TANVLTFGA	36
	BV11	BV11-FWD	YLCASSE*FWDRGAVFWRRL	8
	BV12	BV12-ISD	VYFCAISDMSWEQYFGPGTR	3.3
	BV13	BV13-QGG	YFCASSQGGEQYFGPGTRLT	16
	BV14	BV1-RWG	YFCASRWGSRADTQYFGPGT	8.4
	BV15	BV15-SDS	LYFCATSDSHPRSLCLSHQK	19.4
	BV16	BV16-EDR	FCASSQEDRGTYGYTFGSG	22.4
	Bv17	BV17-RNY	CASSRRNYGYTFGSG	17
Пациент VA	BV5	BV5-LDT	CASSLDTEAFFGQG	10
	BV7	BV7-YTP	CASSYTPGQGEAFFGQG	17
	BV7	BV7-QLI	CASNQLIGGIWGSNQPQHFGDG	11
	BV9	BV9-QVP	CASSQVPPEQFFGPG	12
	BV14	BV14-FEG	CASSFEGNYGYTFGSG	11

* % от общего числа проанализированных клонов клонотеки (BVn)

Последующий анализ структуры ТкР заключался в сравнении строения CDR3 доменов всех шести типов ТкР. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности ТкР Т-клонов в области CDR3, являющиеся уникальными и определяющими специфичность Т-клеточного рецептора, представлены на **рисунке 2**. Как следует из данных, приведенных на рисунке, антиген-распознающий домен 6-ти типов ТкР имеет весьма близкое строение. В первом положении CDR3 домена близкие по свойствам аминокислоты алифатического ряда (аланин или глицин) найдены у 5-ти типов. Совпадающие или близкие по свойствам

аминокислоты также обнаружены в положениях 3 и 5 большей части сравниваемых ТкР. Аминокислоты во втором и четвертом положениях совпадают у всех 6-ти типов. Последовательность из 16-ти аминокислотных остатков (положение 6-21) является полностью идентичной. Выявленная крайне высокая степень гомологии аминокислотных последовательностей CDR3 доменов рассматриваемых типов ТкР может указывать на идентичность узнаваемого ими пептида. Из сравнении результатов анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей CDR3 участка ТкР мы сделали предположение о независимом происхождении Т-клеточных клонов из различных тимоцитов, активированных посредством взаимодействия со структурно схожим(и) или идентичным(и) антигеном(ами).

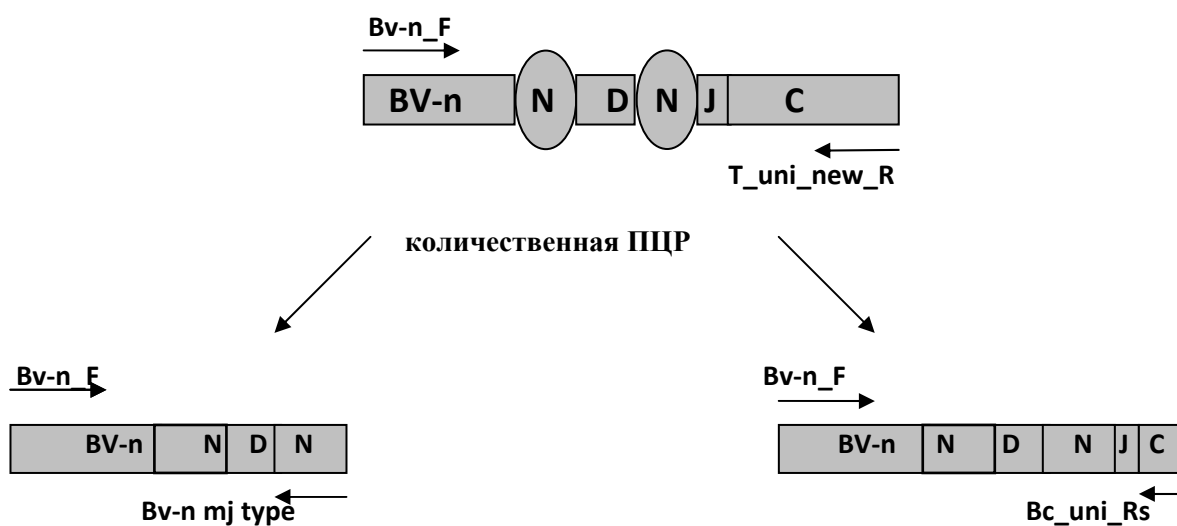
Под тип	TCR BV2	(N) _n D(N) _n	BJ	BC
Тип1	TTC TAC ATC TGC AGT GCT AGA F Y I C S A R	GGG GAT ACC GGG ACA GGC TAC GAG CAG TAC TTC GGG CCG GGC ACC AGG CTC ACG GTC ACA GAG <u>G</u> <u>D</u> T <u>G</u> T <u>G</u> Y E Q Y F G P G T R L T V T E	GAC CTG AAA AAC GTG TTC D L K N V F	
Тип2	TTC TAC ATC TGC AGT GCT AGA F Y I C S A R	GCC GAT AGC GGG AAT GGC TAC GAG CAG TAC TTC GGG CCG GGC ACC AGG CTC ACG GTC ACA GAG <u>A</u> <u>D</u> S <u>G</u> N <u>G</u> Y E Q Y F G P G T R L T V T E	GAC CTG AAA AAC GTG TTC D L K N V F	
Тип3	TTC TAC ATC TGC AGT GCT AGA F Y I C S A R	GGT GAC AGG GGC CAT GGC TAC GAG CAG TAC TTC GGG CCG GGC ACC AGG CTC ACG GTC ACA GAG <u>G</u> <u>D</u> R <u>G</u> H <u>G</u> Y E Q Y F G P G T R L T V T E	GAC CTG AAA AAC GTG TTC D L K N V F	
Тип4	TTC TAC ATC TGC AGT GCT AGA F Y I C S A R	GCC GAC AGG GGG GAG GGC TAC GAG CAG TAC TTC GGG CCG GGC ACC AGG CTC ACG GTC ACA GAG <u>A</u> <u>D</u> R <u>G</u> E <u>G</u> Y E Q Y F G P G T R L T V T E	GAC CTG AAA AAC GTG TTC D L K N V F	
Тип5	TTC TAC ATC TGC AGT GCT AGA F Y I C S A R	GAG GAT AGG GGG CGC GGG TAC GAG CAG TAC TTC GGG CCG GGC ACC AGG CTC ACG GTC ACA GAG E <u>D</u> R <u>G</u> R <u>G</u> Y E Q Y F G P G T R L T V T E	GAC CTG AAA AAC GTG TTC D L K N V F	
Тип6	TTC TAC ATC TGC AGT GCT AGA F Y I C S A R	GGC GAC AGG GGA GAG GGC TAC GAG CAG TAC TTC GGG CCG GGC ACC AGG CTC ACG GTC ACA GAG <u>G</u> <u>D</u> R <u>G</u> E <u>G</u> Y E Q Y F G P G T R L T V T E	GAC CTG AAA AAC GTG TTC D L K N V F	

Рисунок 2. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности Т-клеточного рецептора BV2 семейства выявленных Т-клонов. TCR BV2 – обозначена переменная область гена соответствующая второму семейству ТкР; (N)_nD(N)_n – обозначена гипервариабельный участок гена BV2 семейства ТкР; BJ – J-регион ТкР; BC – константная область гена ТкР; рамкой выделена гипервариабельная область (CDR3) и J-регион генов ТкР BV2 семейства; серым цветом выделены идентичные аминокислоты во всех шести типах ТкР Т-клонов; серым цветом и жирным шрифтом обозначены идентичные аминокислоты, присутствующие в двух и более типах ТкР; серым цветом и подчеркиванием обозначены не идентичные аминокислоты относящиеся к одному классу (алифатические аминокислоты)

3. Мониторинг клональной экспансии.

С целью подтверждения предполагаемой экспансии Т-клеточных клонов, несущих однотипные ТкР, была разработана и применена схема мониторинга Т-клонов в крови пациента на протяжении трех лет наблюдения. Для определения динамики изменения представленности каждого из Т-клонов в общем пуле периферических Т-лимфоцитов были подобраны дискриминирующие праймеры для каждого ранее выявленных клонотипов ТкР V ν семейств и проведена количественная ПЦР серии образцов кДНК. Праймеры использованные для количественной ПЦР, были специфичны к последовательности CDR3 участка зрелых генов ТкР изучаемых семейств BV. Для повышения специфичности количественной ПЦР была разработана схема двустадийного ПЦР-анализа суммарной кДНК периферических Т-лимфоцитов (рисунке 3).

Ампликон BV-n семейства



ПЦР продукт CDR3 T-клона

ПЦР продукт BV-n семейства

Рисунок 3. Схема двухраундовой ПЦР. BV-n - обозначена переменная область гена соответствующая одному из изучаемых семейств ТкР; N- произвольные нуклеотиды; D – D область гена ТкР; J – J область гена ТкР; C – константная область гена ТкР; расположение и ориентация праймеров специфичных к переменной области BV-n (праймер BV-n_F), константной области C (праймер T_uni_new_R), константной области C и J региону (праймер Bc_uni_Rs) и гипервариабельному участку (праймеры Bv-n mj type) гена BV-n ТкР обозначены горизонтальными стрелками.

На первой стадии с помощью селективной ПЦР были амплифицированы кДНК библиотеки ТкР семи семейств BV с использованием праймеров Bv-n_F и T_uni_new_R. Далее, на второй стадии анализа, мы проводили количественную ПЦР в режиме реального времени с использованием праймера Bv-n_F и одного из специфических праймеров Bv-n_mj, с использованием в качестве матрицы 20-кратного разведения ПЦР продуктов, полученных на первой стадии. Параллельно проводилась количественная ПЦР

амплификация кДНК ТкР всего семейства с использованием «заглубленного» праймера T_uni_new_Rs. Таким образом, с помощью ПЦР в реальном времени была проведена количественная оценка экспансии Т-клонов относительно общего числа периферических Т-лимфоцитов, несущих анализируемое семейство ТкР. Данные количественных ПЦР, обработанные согласно математической модели Пфафла, приведены в таблице 1 для каждого из ранее выявленных CDR3-типов Т-клонов семи V α семейств.

Таблица 2. Мониторинг представленности амплифицированных Т-клонов у пациента SL.

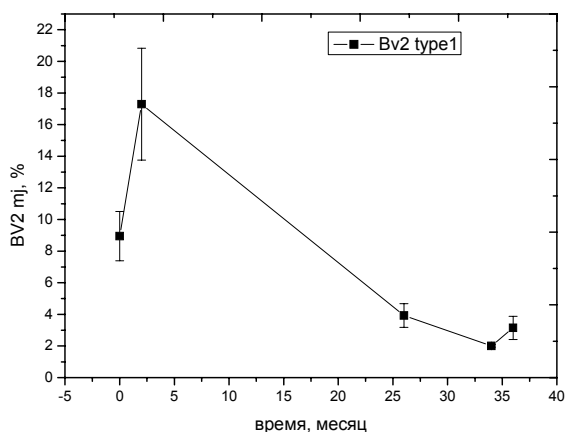
Т-клон	Аминокислотная последовательность Т-клонотипа (CDR3-регион)	ноябрь 2005	июнь 2006	май 2008
BV1-VAL	CASSVALGLNYYEQYFGPG	50.2% +/- 6.8%	52.8% +/-7%	61.0% +/-2%
BV2-DTG	CSARGDTGTGYEQYFGPG	12.1% +/-1%	15.8% +/-1.1%	10.8% +/-1.3%
BV4-VRG	CSVRGSEDTQYFGPG	4.3% +/-0.3%	3.0% +/-0.3%	3.8% +/-0.9%
BV7-TTG	CASSPTTGTIANYG YTFGSG	6.4% +/-0.8%	7.1% +/-0.9%	5.7% +/-0.7%
BV14-RWG	CASRWGSRADTQYFGPG	5.6% +/-0.5%	6.1% +/-1.5%	4.7% +/-1.15%
BV16-EDR	CASSQEDRGTLYGYTFGSG	5.3% +/-0.4%	4.4% +/-0.9%	4.5% +/-0.1%
BV17-RNY	CASSRRNYGYTFGSG	9.6% +/-0.4%	6.5% +/-1.4%	10.5% +/-0.6%

Нами было более детально рассмотрено семейство BV2, так как для него было выявлено наличие составного клонотипа, включающего 6-ть подтипов высокомолекулярных ТкР. Для выявленных подтипов Т-клонов BV2 семейства, так же, были подобраны праймеры специфичные к последовательности CDR3 участка зрелых генов ТкР. Далее, с использованием подхода, описанного выше, была дана количественная оценка представленности данных подтипов в общем пуле периферических Т-лимфоцитов. Полученные в результате количественных ПЦР данные, обработанные согласно математической модели Пфафла, приведены на **рисунке 4** для каждого из шести выявленных типов CDR3 ТкР V α 2 семейства Т-клонов.

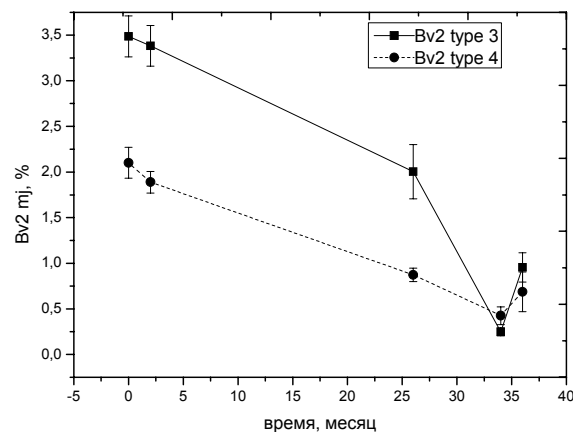
Для всех исследуемых в настоящей работе клонов Т-лимфоцитов показана явно выраженная, относительно стабильная и долговременная клональная экспансия.

Полученные результаты представляют один из немногих опубликованных случаев одновременной продолжительной и стабильной экспансии нескольких Т-клеточных клонов, происходящих от различных предшественников, но экспрессирующих сходные по строению зрелые гены ТкР с высокомолекулярными CDR3 доменами, в периферической крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

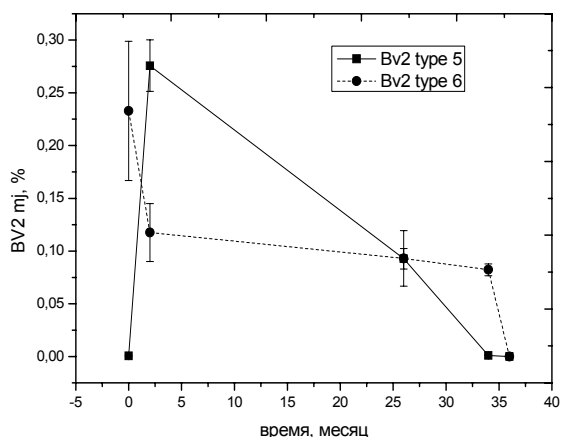
(a)



(б)



(в)



(г)

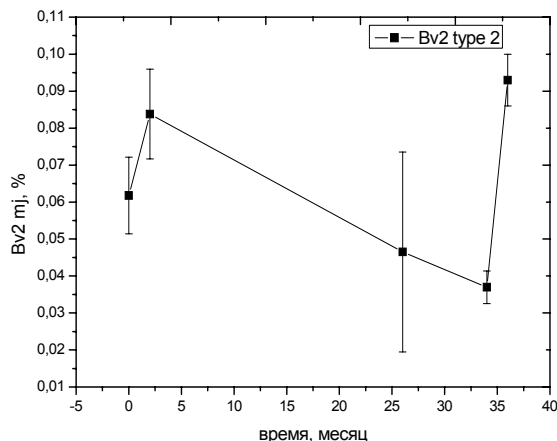


Рисунок 4. Динамика изменения представленности Т-клонов BV2 семейства ТкР.

(a) - динамика изменения представленности Т-клона первого типа (тип 1 на рис. 4а) относительно общей популяции BV2 Т-лимфоцитов; (б) - представленность Т-клонов типов 3 и 4; (в) - Т-клона тип 5 и 6; (г) - Т-клона тип 2.

4. Функциональная характеристика отдельных Т-клонов.

На основе литературных данных мы предположили, что обнаруженные перепредставленные клоны Т-лимфоцитов могут находиться в различных функциональных состояниях и принадлежать к разным субпопуляциям Т-клеток. Для характеристики субпопуляций используются различные методы, основанные на дифференциальной экспрессии различных мембранных молекул (поверхностных маркеров, CD) разными субпопуляциями клеток в зависимости от их функционального статуса.

Для функциональной характеристики ранее выявленных стабильных Т-клонов мы использовали метод проточной цитофлуориметрии для разделения клеток на субпопуляции,

с последующим количественным анализом содержания перепредставленных Т-клонов с помощью ПЦР в реальном времени.

Из образцов периферической крови пациента SL были выделены несколько субпопуляций Т-лимфоцитов, различных по степени активации, а также разделенных по маркерам цитотоксических и хелперных субпопуляций: CD4/CD8, CD27/CD28, CD45.

Использованный подход позволил охарактеризовать ранее выявленные Т-клоны, избегая их индивидуально выделения из периферической крови с последующим культивированием *in vitro*, что могло привести к ошибочной оценке распределения по субпопуляциям, вследствие изменений уровня экспрессии маркеров в условиях *in vitro*.

На первом этапе реализации данной задачи, общий пул моноцитарных клеток периферической крови был разделен на две субпопуляции по маркерам CD4 и CD8, в результате мы получили четыре фракции: CD4-/CD8-, CD4+/CD8+, CD4+/CD8-, CD4-/CD8+. Из каждой полученной фракции была выделена тотальная РНК и построены первые цепи кДНК. Оценка представленности ранее выявленных клонов проводилась с помощью ПЦР в две стадии. На второй стадии использовались CDR3-специфические праймеры, соответствующие последовательности гипервариабельной области обнаруженных перепредставленных клонов. Полученные продукты амплификации были проанализированы с помощью электрофоретического анализа в 1,2 % агарозном геле. Фрагмент электрофоретического анализа представлен на **рисунке 5**.

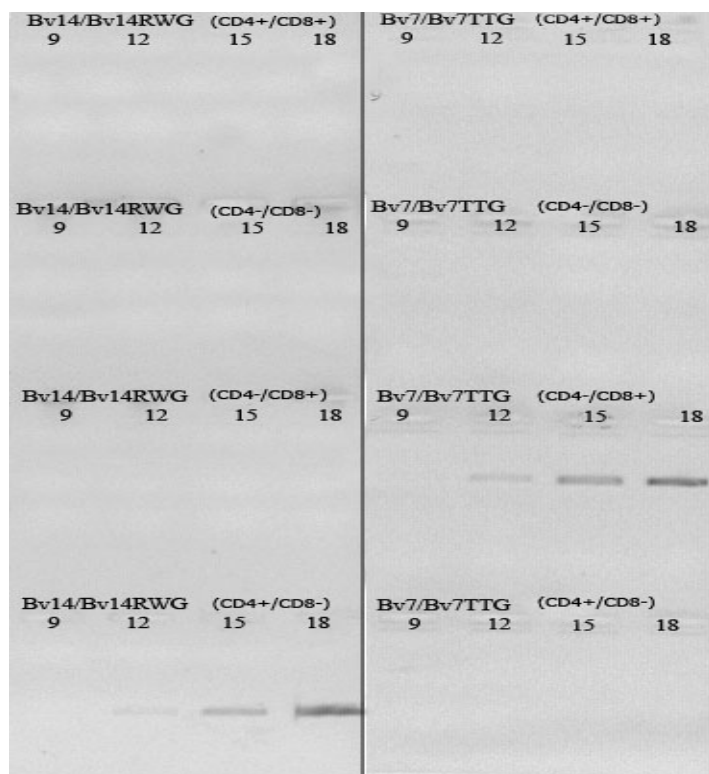


Рисунок 5. Фрагмент электрофоретического анализа для амплифицированных клонов BV14-RWG и BV7-TTG.

Из рисунка 5 видно распределение выявленных Т-клонов по субпопуляциям CD4/CD8.

При анализе указанных четырех субпопуляций было показано, что большинство амплифицированных клонов относятся к CD8⁺ субпопуляции, т.е. к цитотоксическим Т-лимфоцитам, и только один клон является CD4⁺ - т.е. относится к субпопуляции Т-хелперов. Результаты представлены в таблице 3.

Используя аналогичный подход, были получены образцы первых цепей кДНК для следующих субпопуляций Т-лимфоцитов: CD27⁻/CD28⁻, CD27⁺/CD28⁺, CD27⁻/CD28⁺, CD27⁺/CD28⁻, а также: CD27⁻/CD45RA⁻, CD27⁺/CD45RA⁺, CD27⁻/CD45RA⁺, CD27⁺/CD45RA⁻. Далее была дана количественная оценка представленности Т-клонов с помощью ПЦР в реальном времени, с использованием CDR3-специфических праймеров. Результаты суммированы в таблице 3.

В настоящее время считается, что цитотоксические Т-лимфоциты (CD8⁺ Т-лимфоциты) с фенотипом CD28⁺/CD45RA⁻ или CD27⁺/CD45RA⁻ являются клетками памяти не способными к продукции перфорина, либо продуцируют его на низком уровне, но продуцируют цитокины. CD8⁺ Т-клетки с фенотипом CD28⁻/CD45RA⁺ или CD27⁻/CD45RA⁺ - являются короткоживущими терминальными эффекторами Т-клеток и обладают высокой степенью продукции перфорина и ограниченным уровнем продукции цитокинов. CD8⁺ Т-клетки с фенотипом CD28⁻/CD45RA⁻ или CD27⁻/CD45RA⁻ продуцируют перфорин на среднем уровне и представляют собой промежуточное звено между эффекторными клетками и Т-клетками памяти, т.е. эффекторные Т-лимфоциты памяти.

Из представленных в Таблице 3 данных видно, что амплифицированные клоны BV1-VAL, BV2-DTG, и BV7-TTG практически полностью состоят из клеток с фенотипом CD27⁻/CD28⁻, что характеризует высокую цитотоксичность данных Т-клонов. Так же клетки клона BV1-VAL и 2 по большей мере относятся к эффекторным Т-лимфоцитам памяти, и в меньшей к эффекторным Т-клеткам. Клон BV7-TTG на 90% состоит из клеток с фенотипом CD27⁻/CD45RA⁺, что относит его к группе эффекторных Т-лимфоцитов и так же подтверждает его высокую цитотоксичность. Клон BV16-EDR в большей степени несет фенотип CD27⁺/CD45RA⁻ или CD28⁺/CD45RA⁻, на основании чего его можно отнести к Т-лимфоцитом памяти. Клон BV17-RNY так же в большей степени состоит из клеток памяти имеющих фенотип CD27⁺/CD45RA⁻. Клон BV14-RWG относится к субпопуляции хелперных Т-лимфоцитов и так же его можно отнести к эффекторным клеткам памяти.

Обнаруженные нами стабильно существующие перепредставленные клоны Т-лимфоцитов в основном представляют собой популяцию цитотоксических короткоживущих терминально дифференцированных эффекторных клеток, практически не представленных

клетками памяти. За исключением клонов BV16-EDR и BV17-RNY, большая часть которых является клетками памяти.

Таблица 3. Количественная представленность стабильных амплифицированных клонов в ряде субпопуляций Т-лимфоцитов.

Амплифицированные Т-клоны (пациент SL)	CD4/CD8	CD27/CD28 фракции				CD27/CD45RA фракции			
		CD27+ CD28+	CD27+ CD28-	CD27- CD28+	CD27- CD28-	CD27+ CD45RA+	CD27+ CD45RA-	CD27- CD45RA-	CD27- CD45RA+
BV1_VAL	CD8	-	-	2%	98%	-	-	66%	33%
BV2_DTG	CD8	-	-	2%	98%	-	-	66%	33%
BV4_VRG	CD8	66%	33%	-	-	нд	нд	-	-
BV7_TTG	CD8	-	-	-	100%	-	-	10%	90
BV14_RWG	CD4	-	-	66%	33%	-	-	100%	-
BV16_EDR	CD8	50%	25%	-	25%	-	75%	25%	-
BV17_RNY	CD8	-	66%	-	33%	-	66%	-	33%

% - удельное содержание Т-лимфоцитов указанного клонотипа в пуле фракции CD27/CD28.

5. Поиск партнерской α -цепи ТкР

Поскольку взаимодействие ТкР с антигеном в составе МНС I класса определяется $\alpha\beta$ -гетеродимером ТкР, мы сделали попытку определения партнерских α -цепей для клонов BV1 семейства.

Для выявления партнерской α -цепи был разработан новый экспериментальный подход, заключающийся в оценке разнообразия α -цепей ТкР в популяции Т-лимфоцитов, экспрессирующих ТкР BV1 семейства. Из образца крови пациента SL, для которого ранее была показана высокая представленность Т-клона BV1- VAL, была выделена субпопуляция Т-клеток, экспрессирующих ТкР BV1 семейства. Из клеток полученной моноцитарной фракции была выделена тотальная РНК и построены первые цепи кДНК.

Для реализации поставленной задачи была разработана система праймеров, позволяющих амплифицировать кДНК широкого набора отдельных AV-семейства ТкР. Получение ПЦР-библиотек AV-семейств с образца кДНК осуществляли с использованием пары праймеров, TRAV_n, соответствующего вариабельной части αV гена ТкР, и Alpha const, соответствующего константной части гена α -цепи ТкР (**рисунок 6**).

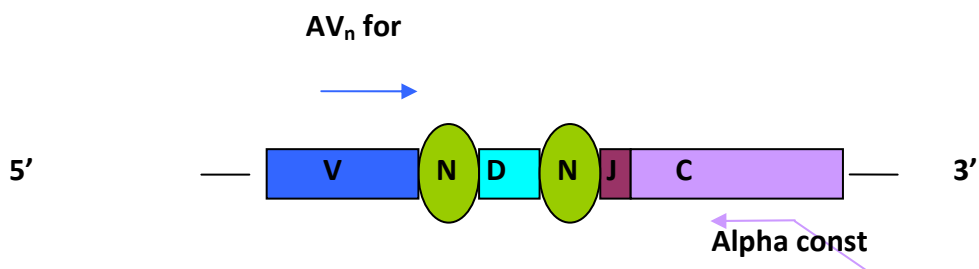


Рисунок 6. Схема ПЦР: получение ПЦР-библиотек AV-семейств. Расположение и ориентация праймеров обозначены горизонтальными стрелками.

Продукты амплификации были проанализированы с помощью электрофоретического анализа в 1,2% агарозном геле, представленном на **рисунке 7**.

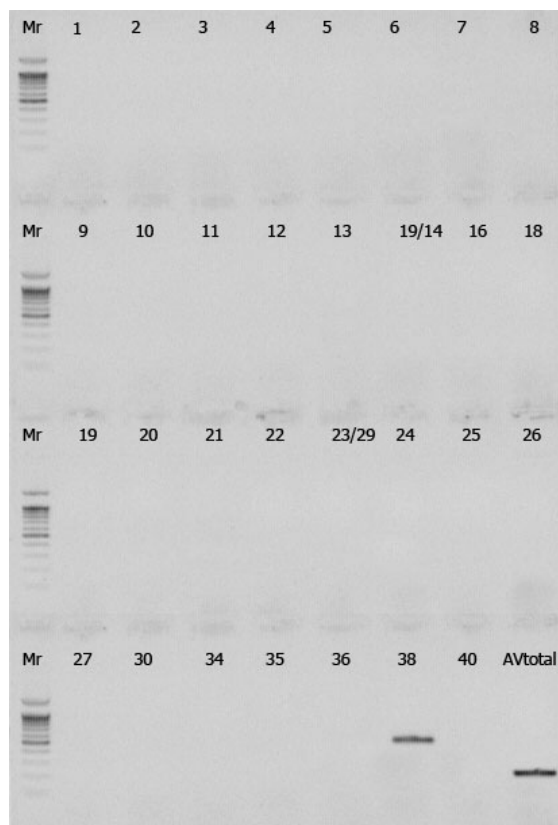


Рисунок 7. Качественный анализ 31-го гена α -цепей ТкР.

По результатам ПЦР-анализа сделано заключение, что в исследуемом образце кДНК фракции BV1+ Т-клеток наиболее представленной является α -цепь 38го семейства.

Для подтверждения полученных результатов нами была произведена количественная оценка представленности транскрипта гена 38 семейства α -цепей ТкР относительно транскриптов всех генов альфа цепей, имеющих в образце РНК из выделенной популяции BV1+ Т-клеток. Количественную оценку производили методом ПЦР в реальном времени. Эксперимент проводили в трех независимых повторностях. Полученные данные представлены в виде графика зависимости относительной флуоресценции от количества циклов ПЦР на **рисунке 8** и были обработаны согласно математической модели Пфафла.

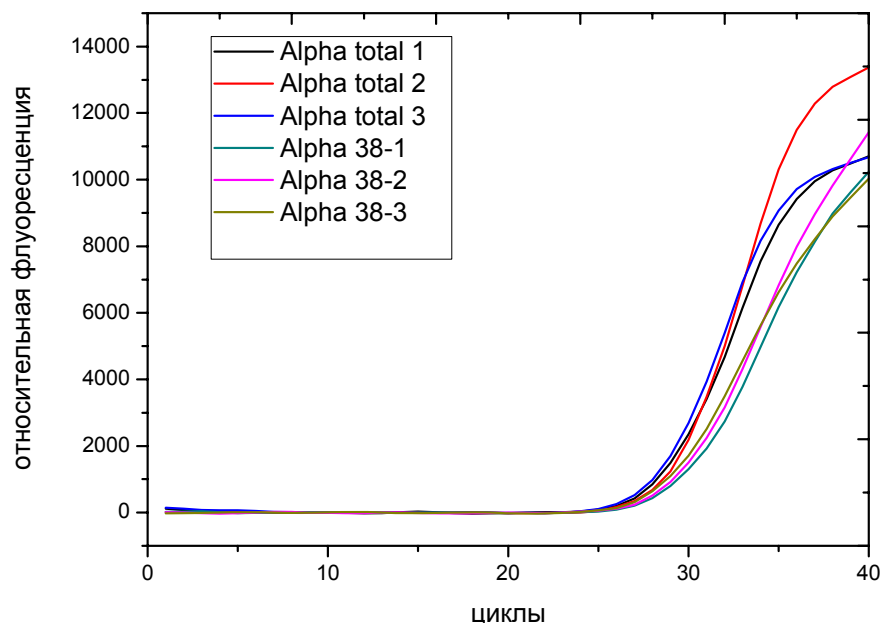


Рисунок 8. Количественная оценка транскрипта гена 38 семейства α - цепей ТкР.

Доля AV38 относительно общего количества α -цепей была рассчитана согласно формуле:

$$AV38, \% = \frac{(E_{AVtotal})^{Ct_{AVtotal}}}{(E_{AV38})^{Ct_{av38}}} \times 100\%$$

E-эффективность ПЦР-амплификации, оценивалась с помощью программы LinRegPCR.

Значение Ct было выбрано выше уровня базовой флуоресценции, в пределах фазы экспоненциального накопления флуоресцентного продукта реакции. Полученные результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Расчет % AV38 по методу Пфафла.

Независимые повторности	E_{AV38}	Ct_{AV38}	E_{Atotal}	Ct_{Atotal}	AV38, %	Средняя AV38, %
1	1,975	29,14	1,981	28,27	60,27	
2	1,98	28,8	1,979	28,01	57,48	
3	1,988	29,43	1,976	28,63	48,53	55,42 \pm 6,13

6. Ша-типирование пациентов АС.

Известно, что важнейшим фактором патогенеза АС является семейная предрасположенность, маркером которой считается одна из разновидностей антигена

гистосовместимости HLA-B27 - молекулы МНС-I типа, являющиеся лигандами для ТкР цитотоксических лимфоцитов. На данный момент для ряда аллельных вариантов МНС показана связь с повышенным риском развития АС.

Нами было проведено генотипирование по 4м локусам МНС-I типа: HLA-A, B, C и E обоим пациентам АС.

Первые цепи кДНК из клеток периферической крови пациентов были получены стандартным способом, описанным в разделе Материалы и методы. Далее, с помощью универсальных праймеров HLA-for/HLA-rev, специфичных к консервативным областям белок-кодирующих последовательностей всех четырех локусов (*HLA-A, B, C* и *E*), была наработана библиотека ПЦР-продуктов для каждого пациента. После очистки ПЦР-библиотеки были клонированы в плазмидный вектор.

Из клонов, несущих по результатам скрининга (с помощью бело-голубой селекции и ПЦР) целевую вставку, была выделена плазмидная ДНК и проведено определение первичной последовательности вставки. Для каждого пациента было отсеквенировано по 200 клонов.

После сравнения полученных нами последовательностей кДНК с последовательностями аллельных вариантов *HLA*-локусов, доступных на интернет-ресурсе <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/> для обоих пациентов были определены подгруппы аллелей по локусам *HLA-A, -B, -C* и *E*. Результаты отражены в таблице 5.

Таблица 5. Результаты генотипирования по *HLA* – генам пациентов АС.

Пациент	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-E
SL	A02	B38, B2705	Cw2.2, Cw1203	E0101
VA	A26, A01	Bw72, B2705	Cw2.2	E0101

Выводы

1. Создан новый экспериментальный подход к оценке репертуара периферических Т-лимфоцитов и идентификации клональной экспансии основанный на масштабном секвенировании кДНК β -цепей Т-клеточных рецепторов и сравнительном структурном анализе антиген-распознающего домена.
2. Показано, что индивидуальные репертуары Т-лимфоцитов больных анкилозирующим спондилитом характеризуются выраженной устойчивостью и долговременно олигоклональной экспансией. В составе репертуаров двух больных выявлен 21 преобладающий клонотип Т-лимфоцитов.
3. Определено фенотипическое разнообразие выявленных клонотипов. Установлено, что единственный найденный клонотип Т-хелперов представлен исключительно эффекторными клетками памяти, а каждый из шести охарактеризованных клонотипов CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов состоит из нескольких субпопуляций Т-лимфоцитов с преобладанием либо эффекторных клеток, либо клеток памяти.
4. Впервые выявлен сложный клонотип цитотоксических Т-лимфоцитов, включающий шесть подтипов независимо сформировавшихся клонов Т-клеток, Т-клеточные рецепторы которых обладают высокомолекулярными антиген-связывающими доменами.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ:

- 1) Mamedov I.Z., Britanova O.V., **Chkalina A.V.**, Staroverov D.B., Amosova A.L., Mishin A.S., Kurnikova M.A., Zvyagin I.V., Mutovina Z.Y., Gordeev A.V., Khaidukov S.V., Sharonov G.V., Shagin D.A., Chudakov D.M., Lebedev Y.B.. Individual characterization of stably expanded T cell clones in ankylosing spondylitis patients // *Autoimmunity*. 2009; 42(6): p. 525-536.
- 2) **Чкалина А.В.**, Звягин И.В., Мамедов И.З., Британова О.В., Староверов Д.Б., Лебедев Ю.Б.. Олигоклональная экспансия Т-клеток: изучение ее стабильности во времени // *Биоорганическая химия*. 2010; 36(2): с. 206-214
- 3) Zvyagin I.V., Mamedov I.Z., Britanova O.V., Staroverov D.B., Nasonov E.L., Bochkova A.G., **Chkalina A.V.**, Kotlobay A.A., Korostin D.O., Rebrikov D.V., Lukyanov S., Lebedev Y.B., Chudakov D.M.. Contribution of functional KIR3DL1 to ankylosing spondylitis // *Cellular and Molecular Immunology*. 2010; 7(6): p. 471-476.
- 4) Mamedov I.Z., Britanova O.V., Bolotin D.A., **Chkalina A.V.**, Staroverov D.B., Zvyagin I.V., Kotlobay A.A., Turchaninova M.A., Fedorenko D.A, Novik A.A., Sharonov G.V., Lukyanov S., Chudakov D.M., Lebedev Y.B.. Quantitative tracking of T cell clones after haematopoietic stem cell transplantation // *EMBO Mol Med*. 2011; 3(4): p.201-207.
- 5) Britanova O.V., Staroverov D.B., **Chkalina A.V.**, Kotlobay A.A., Zvezdova E.S., Bochkova A.G., Chudakov D.M. Single high-dose treatment with glucosaminyl-muramyl dipeptide is ineffective in treating ankylosing spondylitis // *Rheumatol Int*. 2011; 31(8): p. 1101-1103.

Материалы конференций:

- 1) **Чкалина А.В.**, Звягин И.В., Мамедов И.З., Лебедев Ю.Б. Новый метод выявления клональной экспансии Т-лимфоцитов. // XXI зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2009; сборник тезисов, с. 60.
- 2) Звягин И.В., **Чкалина А.В.**, Котлобай А.А., Анисимова В.Е., Мамедов И.З., Лебедев Ю.Б. Создание гибридных белков, содержащих TCR-V β , для элиминации семейства Т-лимфоцитов // XXI зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2009; сборник тезисов, с. 58.
- 3) Mamedov I.Z., Britanova O.V., **Chkalina A.V.**, Zvyagin I.V., Staroverov D.B., Amosova A.L., Chudakov D.M., Lebedev Y.B. Detection, study of stability and characterization of expanded T cell clones in patients with AS // 15th International Summer School on Immunology "IMMUNE SYSTEM: GENES, RECEPTORS AND REGULATION", Hvar, Croatia, 2009; Abstract book, p. 134.
- 4) I.V. Zvyagin, I.Z. Mamedov, **A.V. Chkalina**, D.M. Chudakov, S.A. Lukyanov, Y.B. Lebedev. Involvement of KIR3D receptor functional variants in ankylosing spondylitis initiation. // *New Biotechnology*. Abstracts of the 4th ESF Conference on Functional Genomics & Disease. Dresden, Germany, 2010; 275: p. s60.

- 5) I. V. Zvyagin, V. Y. Dorodnykh, I. Z. Mamedov, **A. V. Chkalina**, D. M. Chudakov, Y. B. Lebedev. Analysis of association of 5 ERAP1 SNPs and KIR3D alleles in patients with ankylosing spondylitis. // 14th International Congress on Immunology, Kobe, Japan, 2010; Abstract book, p. i128.
- 6) I. V. Zvyagin, I. Z. Mamedov, **A. V. Chkalina**, V. Y. Dorodnykh, D. M. Chudakov, S. A. Lukyanov, Y. B. Lebedev. Role of KIR3D receptor functional variants in ankylosing spondylitis. // European Journal of Human Genetics. Abstracts of the European Human Genetics Conference 2011. Amsterdam, The Netherlands, 2011; 19(S2): p. 383.
- 7) I. Zvyagin, V. Dorodnykh, I. Mamedov, D. Khmelkova, **A. Chkalina**, D. Chudakov, S. Lukyanov, Y. Lebedev. Analysis of association of several non-MHC loci with ankylosing spondylitis in Russian population // FEBS Journal. Abstracts of the 36th FEBS Congress. Torino, Italy, 2011; 278(S1): p. 255.