

УДК 571.27

ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИГЕННЫЙ ЭПИТОП И ТИОРЕДОКСИН ДЛЯ *IN VITRO* СТИМУЛЯЦИИ CD4⁺ TCR⁺ JURKAT T-КЛЕТОК

© 2024 г. И. А. Ишина^{1,*}, М. Ю. Захарова^{1,**}, И. Н. Курбачкая¹,
А. Э. Мамедов¹, А. А. Белогуров^{1,2}, Ю. П. Рубцов¹, академик РАН А. Г. Габитов^{1,3,4}

Поступило 02.03.2024 г.

После доработки 10.03.2024 г.

Принято к публикации 15.03.2024 г.

Исследование CD4⁺ Т-клеточного ответа, а также специфичности Т-клеточных рецепторов (TCR) имеет ключевое значение для изучения этиологии иммунных заболеваний и разработки их целевой терапии. Растворимость, доступность и стабильность синтетических антигенных пептидов, используемых при оценке специфичности Т-клеток, имеют критическую важность. В данной работе мы используем репортерную систему активации Т-клеток с использованием рекомбинантных белков, содержащих антигенные эпитопы, слитые с бактериальным тиоредаксином (trx-пептидами), полученных с помощью бактериальной экспрессии. Совместная инкубация CD4⁺ HA1.7 TCR⁺ репортерных клеток Jurkat 76 TRP с CD80⁺ HLA-DRB1*01:01⁺ клетками HeLa или CD4⁺ Ob.1A12 TCR⁺ Jurkat 76 TRP с CD80⁺ HLA-DRB1*15:01⁺ клетками HeLa приводит к активации Jurkat 76 TPR при добавлении trx-пептидов, содержащих TCR-специфичные эпитопы. Trx-пептиды проявили сопоставимый потенциал активации Jurkat 76 TPR в сравнении с синтетическими пептидами. Полученные данные демонстрируют, что тиоредаксин (trx) в качестве белка-носителя оказывает минимальное влияние на распознавание TCR и последующую активацию Т-клеток. Наши результаты подчеркивают потенциальную возможность использования trx-пептидов в качестве реагента для оценки иммуногенности антигенных фрагментов.

Ключевые слова: МНС-II, презентация антигенов, Jurkat 76 TPR, CD80⁺ HeLa

DOI: 10.31857/S2686738924030119, **EDN:** VTFRUM

CD4⁺ Т-клетки играют основную роль в регуляции иммунного ответа. Активация CD4⁺ Т-клеток зависит от узнавания антигенных пептидов, представленных в комплексах с молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса (МНС-II) (рМНС), которые экспонируются на антигенпрезентирующих клетках (АПК) [1–3]. Необходимо тестирование множества потенциальных антигенных мишеней для точного определения иммуногенных эпитопов.

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

²Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия

³Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: ishina.irina.a@gmail.com

**e-mail: mariya.zakharova333@gmail.com

Природные АПК, включающие В-клетки, дендритные клетки и макрофаги, не только экспрессируют молекулы МНС-II, но также обеспечивают костимулирующие сигналы (например, посредством CD80, CD86), необходимые для оптимальной активации CD4⁺ Т-клеток. Тем не менее, использование природных АПК сопряжено с различными проблемами из-за их ограниченной доступности. Существуют вычислительные методы прогнозирования иммуногенных эпитопов, однако эти алгоритмы в идеале требуют экспериментальной проверки [4, 5]. Искусственные АПК были разработаны как альтернативный подход к стимуляции CD4⁺ Т-клеток. Например, в качестве АПК можно использовать эритролейкозные клетки человека K562 или клеточные линии фибробластов мыши NIH/3T3, экспрессирующие как костимулирующие молекулы, так и HLA-DR [6, 7]. В настоящей работе мы определили эффективность trx-пептидов, полученных в прокариотической системе экспрессии, для связывания и активации антиген-специфичных клеток CD4⁺ Jurkat 76 TPR.

Мы использовали линию клеток HeLa, в которой отсутствует эндогенная экспрессия молекул

МНС-II, тем самым предотвращая перекрестную презентацию антигенных пептидов. Ранее созданную клеточную линию CD80⁺ HeLa [8] трансдуцировали лентивирусами, кодирующими HLA-DRB1*01:01 и HLA-DRB1*15:01. Лентивирусы собирали через 48 часов после котрансфекции клеток НЕК 293Т конструкциями, содержащими кодирующую последовательность β/α-цепей МНС-II, разделенных пептидом 2А (Т2А), и упаковывающими плазмидами. В качестве CD4⁺ Т-клеток использовали ранее разработанные клеточные линии — CD4⁺ HA1.7 TCR⁺ и CD4⁺ Ob.1A12 TCR⁺ Jurkat 76 TPR [8], полученные путем последовательной трансдукции CD4⁺ и TCR-кодирующими лентивирусами клеточной линии Jurkat 76 TPR [8, 9]. TCR HA1.7 специфичен к фрагменту гемагглютинаина А гриппа (HA_{306–318}) в комплексе с HLA-DRB1*01:01 и обладает высокой аффинностью к рМНС [10]. TCR Ob.1A12 специфичен к фрагменту основного белка миеллина (MBP) (MBP_{85–99}) в комплексе с HLA-DRB1*15:01 и имеет низкую аффинность к рМНС благодаря аутоиммунному происхождению [11]. В клетках Jurkat 76 TPR отсутствует эндогенный αβ TCR, что снижает риск неправильного спаривания цепей TCR. Кроме того, эти клетки экспрессируют NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток)-зависимый флуоресцентный репортер GFP при стимуляции TCR или химерного антигенного рецептора (CAR), что можно легко оценить с помощью проточной цитометрии. В совокупности совместное культивирование клеток CD80⁺ HLA-DRB1⁺ HeLa и клеточных линий CD4⁺ TCR⁺ Jurkat 76 TPR представляет удобную платформу для оценки иммуногенности антигенных пептидов.

Высокополиморфные молекулы МНС-II имеют открытую борозду связывания пептидов, вмещающую длинные пептиды и даже белки, в отличие от МНС-I. Твердофазный синтез пептидов в случае

относительно длинных молекул является дорогостоящим и труднодоступным. Чтобы решить эту проблему, мы использовали слитые пептиды, которые можно производить в *E. coli* в больших количествах с низкими затратами. Ранее мы продемонстрировали, что белок-носитель trх способствует связыванию пептидных эпитопов с сывороточными аутоантителами пациентов с рассеянным склерозом [12]. Кроме того, trх увеличивает выход экспрессии, улучшает растворимость и стабильность антигенных пептидов, что может быть критическим моментом для синтетических аналогов. Мы использовали ранее опубликованные конструкции, содержащие пептид (HA_{306–318} (PKYVKQNTLKLAT) или MBP_{81–104} (QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQG)), связанный через серин-глициновый линкер с С-концом бактериального trх, меченного кластером 6xHis [13]. Конструкция, содержащая только trх-6His и серин-глициновый линкер, использовалась в качестве отрицательного контроля.

Штамм *E. coli* BL21(DE3) трансформировали ДНК, кодирующей соответствующие экспрессирующие trх-слитые конструкции, и свежетрансформированные бактерии выращивали в жидкой среде до достижения оптической плотности OD₆₀₀ = 0.6. После индукции изопропил-β-D-1-тиогалактопираниозидом (IPTG) клетки выращивали при 37 °C в течение еще 16 часов, затем лизировали. Трх-пептиды очищали с помощью аффинной хроматографии на агарозе никель-нитрилотриуксусной кислоты (Ni-NTA) (рис. 1). Чистота выделенных белков превышала 90% при анализе с помощью электрофореза SDS-PAGE. Активацию клеток CD4⁺ TCR⁺ Jurkat 76 TPR по экспрессии GFP оценивали методом проточной цитометрии. Презентацию trх-пептидов осуществляли одновременно с совместной инкубацией клеток CD80⁺ HLA-DRB1⁺ HeLa и клеток CD4⁺ TCR⁺ Jurkat

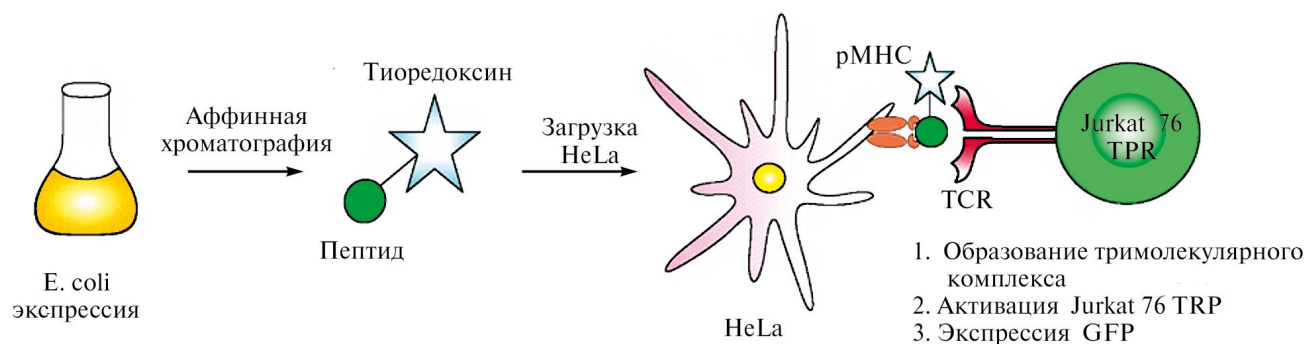


Рис. 1. Схематическое изображение использования trх-пептидов для активации CD4⁺ TCR⁺ клеток Jurkat 76 TPR. Трх-пептиды экспрессировались в *E. coli* с последующей очисткой с помощью Ni-NTA. Полученный белок загружали на HLA-DRB1*01:01 или HLA-DRB1*15:01 клеточных линий CD80⁺ HeLa и инкубировали с соответствующей клеточной линией CD4⁺ TCR⁺ Jurkat 76 TPR. Последующая активация клеточной линии CD4⁺ TCR⁺ Jurkat 76 TPR происходила за счет образования тримолекулярного комплекса и оценивалась благодаря экспрессии GFP, вызванной активацией NFAT.

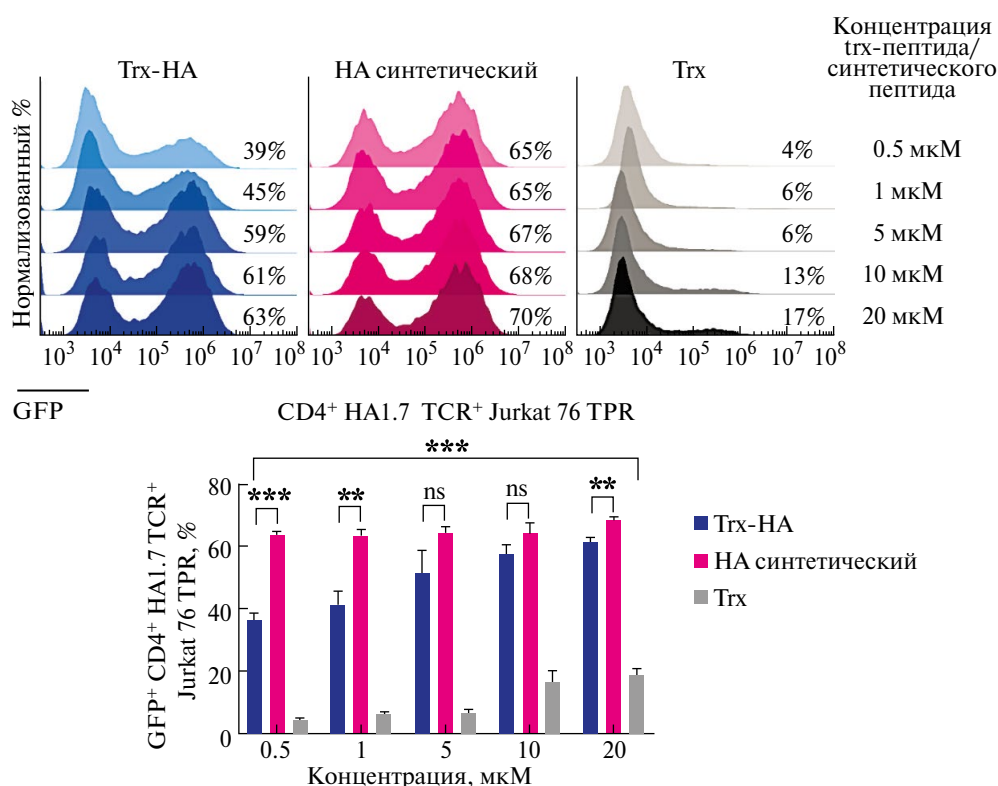


Рис. 2. Стимуляция $CD4^+ HA1.7^+ TCR$ Jurkat 76 TPR клетками $CD80^+ HLA-DRB1^*01:01^+$ HeLa, праймированными эпитопами MHC-II. $CD4^+ HA1.7 TCR^+ Jurkat 76 TPR$ клетки инкубировали с $CD80^+ HLA-DRB1^*01:01^+$ HeLa в течение 16 часов с синтетическим пептидом HA или trx-HA в концентрации 0.5, 1, 5, 10 и 20 мкМ. Носитель trx использовали в качестве отрицательного контроля. Анализ проводили с помощью проточной цитометрии. Значения указывают процент активированных клеток, экспрессирующих GFP. Показаны репрезентативные профили проточной цитометрии. Процент GFP-положительных клеточных линий $CD4^+ HA1.7 TCR^+ Jurkat 76 TPR$, инкубированных с $CD80^+ HLA-DRB1^*01:01^+$ HeLa, загруженными синтетическим пептидом HA или trx-HA в концентрации 0.5, 1, 5, 10 и 20 мкМ, показан как среднее $\pm$ стандартное отклонение трех повторов эксперимента (нижний рисунок). Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Уэлча: ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

76 TPR. Примечательно, что молекулы MHC-II АПК изначально нагружены низкоаффинным пептидом CLIP, что способствует стабильности комплекса MHC-II, который впоследствии вытесняется другими экзогенными пептидами [14]. В нашей экспериментальной системе HLA-DRB1, экспонированный на HeLa, может быть загружен эндогенными пептидами с относительно высоким сродством. Однако высокие концентрации trx-пептидов эффективно вытесняют эндогенные пептиды.

$CD4^+ HA1.7 TCR^+$ клетки Jurkat 76 TPR (100 000 клеток на лунку) инкубировали совместно с $CD80^+ HLA-DRB1^*01:01^+$ клеточной линией HeLa (10 000 клеток на лунку) с различными концентрациями trx-HA (0.5, 1, 5, 10 и 20 мкМ) в течение 16 часов в 96-луночном круглодонном планшете (рис. 2). Синтетический пептид HA_{306–318} (PKYVKQNTLKLAT) служил положительным контролем. Повышение концентрации носителя trx приводило к активации клеток $CD4^+ HA1.7 TCR^+ Jurkat 76 TPR$. Однако процент клеток

$GFP^+ CD4^+ HA1.7 TCR^+ Jurkat 76 TPR$, инкубированных с 20 мкМ носителя trx, был статистически ниже, чем наблюдавшийся при инкубации с 0.5 мкМ trx-HA ($p < 0.001$). Несмотря на то, что синтетический пептид HA демонстрировал более высокий потенциал активации клеток $CD4^+ HA1.7 TCR^+ Jurkat 76 TPR$ по сравнению с trx-HA, инкубация при концентрациях 5 и 10 мкМ не показала статистически значимой разницы между trx-пептидом и синтетическим пептидом.

При инкубации $CD4^+ Ob.1A12 TCR^+ Jurkat 76 TPR$ с $CD80^+ HLA-DRB1^*15:01^+$ HeLa носитель trx практически не способствовал активации (рис. 3). Инкубация с 20 мкМ носителя trx привела к статистически менее значимому проценту популяции GFP^+ , чем инкубация с 0.5 мкМ trx-MBP_{81–104} ($p < 0.01$). Предполагается, что низкая аффинность Ob.1A12 TCR может снижать неспецифическую активацию. По аналогии с $CD4^+ HA1.7 TCR^+ Jurkat 76 TPR$ синтетический пептид (MBP_{85–99} (ENPVVHFFKNIVTPR)) продемонстрировал большую способность активировать

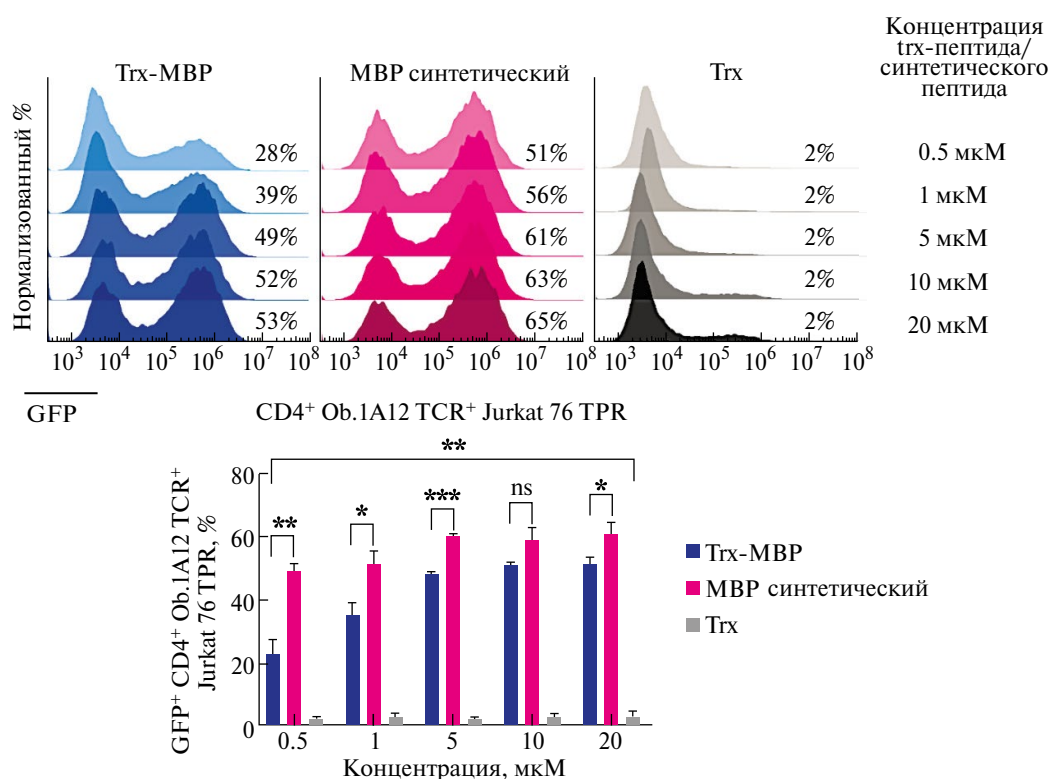


Рис. 3. Стимуляция $CD4^+$ Ob.1A12 TCR $^+$ Jurkat 76 TPR клетками $CD80^+$ HLA-DRB1*15:01 $^+$ HeLa, праймированными эпитопами МНС-II. Клетки $CD4^+$ Ob.1A12 TCR $^+$ Jurkat 76 TPR инкубировали с $CD80^+$ HLA-DRB1*15:01 $^+$ HeLa в течение 16 часов с синтетическим пептидом MBP или trх-MBP в концентрации 0.5, 1, 5, 10 и 20 мкМ. Носитель trх использовали в качестве отрицательного контроля. Анализ проводили с помощью проточной цитометрии. Значения указывают процент активированных клеток, экспрессирующих GFP. Показаны репрезентативные профили проточной цитометрии. Процент GFP-положительных клеточных линий $CD4^+$ Ob.1A12 TCR $^+$ Jurkat 76 TPR, инкубированных с $CD80^+$ HLA-DRB1*15:01 $^+$ HeLa, загруженными синтетическим пептидом MBP или trх-MBP в концентрации 0.5, 1, 5, 10 и 20 мкМ, показан как среднее $\pm$ стандартное отклонение трех экспериментальных повторов (нижний рисунок). Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Уэлча: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

клетки $CD4^+$ Ob.1A12 TCR $^+$ Jurkat 76 TPR по сравнению с trх-MBP. Инкубация с 10 мкМ синтетического или trх-пептида продемонстрировала статистически незначимую разницу в уровне активации.

В заключение наши результаты демонстрируют функциональную значимость trх-пептидов для антиген-специфического взаимодействия и стимуляции клеточных линий $CD4^+$ TCR $^+$ Jurkat 76 TPR. Разработанная методология может быть особенно полезна при анализе криптопептидов МНС-II, проблематичных с точки зрения химического синтеза, растворимости, необычной конформации и вторичной структуры.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы хотели бы поблагодарить Judith Leitner и Peter Steinberger из Венского медицинского университета (Австрия) за предоставление клеточной линии Jurkat 76 TPR.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-44-00043).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эта работа не содержит исследований с участием людей и животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pishesha N., Harmand T.J., Ploegh H.L. A Guide to Antigen Processing and Presentation // Nat. Rev. Immunol. 2022. V. 22. P. 751–764.
2. Santambrogio L. Molecular Determinants Regulating the Plasticity of the MHC Class II Immunopeptidome // Front. Immunol. 2022. V. 13.

3. *Ishina I.A., Zakharova M.Y., Kurbatskaia I.N., et al.* MHC Class II Presentation in Autoimmunity // *Cells*. 2023. V. 12.
4. *Chen B., Khodadoust M.S., Olsson N., et al.* Predicting HLA Class II Antigen Presentation through Integrated Deep Learning // *Nat. Biotechnol.* 2019. V. 37. P. 1332–1343.
5. *Racle J., Guillaume P., Schmidt J., et al.* Machine Learning Predictions of MHC-II Specificities Reveal Alternative Binding Mode of Class II Epitopes // *Immunity*. 2023. V. 56. P. 1359–1375.
6. *Butler M.O., Ansén S., Tanaka M., et al.* A Panel of Human Cell-based Artificial APC Enables the Expansion of Long-lived Antigen-specific CD4⁺ T Cells Restricted by Prevalent HLA-DR Alleles // *Int. Immunol.* 2010. V. 22. P. 863–873.
7. *Garnier A., Hamieh M., Drouet A., et al.* Artificial Antigen-presenting Cells Expressing HLA Class II Molecules as an Effective Tool for Amplifying Human Specific Memory CD4⁺ T Cells // *Immunol. Cell. Biol.* 2016. V. 94. P. 662–672.
8. *Ishina I.A., Kurbatskaia I.N., Mamedov A.E., et al.* Genetically Engineered CD80–pMHC-harboring Extracellular Vesicles for Antigen-specific CD4⁺ T-cell Engagement // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2024. V. 11.
9. *Roskopf S., Leitner J., Paster W., et al.* A Jurkat 76 Based Triple Parameter Reporter System to Evaluate TCR Functions and Adoptive T Cell Strategies // *Oncotarget*. 2018. V. 9. 17608.
10. *Hennecke J., Carfi A., Wiley D. C.* Structure of a Covalently Stabilized Complex of a Human $\alpha\beta$ T-cell Receptor, Influenza HA Peptide and MHC Class II Molecule, HLA-DR1 // *EMBO J.* 2000. V. 19. P. 5611–5624.
11. *Hahn M., Nicholson M.J., Pyrdol J., Wucherpfennig K.W.* Unconventional Topology of Self Peptide–Major Histocompatibility Complex Binding by a Human Autoimmune T Cell Receptor // *Nat. Immunol.* 2005. V. 6. P. 490–496.
12. *Belogurov A.A., Kurkova I.N., Friboulet A., et al.* Recognition and Degradation of Myelin Basic Protein Peptides by Serum Autoantibodies: Novel Biomarker for Multiple Sclerosis // *The Journal of Immunology*. 2008. V. 180. P. 1258–1267.
13. *Mamedov A., Vorobyeva N., Filimonova I., et al.* Protective Allele for Multiple Sclerosis HLA-DRB1*01:01 Provides Kinetic Discrimination of Myelin and Exogenous Antigenic Peptides // *Front. Immunol.* 2020. V. 10.
14. *Álvaro-Benito M., Freund C.* Revisiting Nonclassical HLA II Functions in Antigen Presentation: Peptide Editing and Its Modulation // *HLA*. 2020. V. 96. P. 415–429.

ANTIGENIC PEPTIDE–THIOREDOXIN FUSION CHIMERAS FOR *IN VITRO* STIMULUS OF CD4⁺ TCR⁺ JURKAT T-CELLS

I. A. Ishina^{a, #}, M. Y. Zakharova^{a, ##}, I. N. Kurbatskaia^a, A. E. Mamedov^a,
A. A. Belogurov, Jr.^{a, b}, Y. P. Rubtsov^a, Academician of the RAS A. G. Gabibov^{a, c, d}

^a*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^b*Department of Biological Chemistry, Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation*

^c*Department of Life Sciences, Higher School of Economics, Moscow, Russian Federation*

^d*Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: ishina.irina.a@gmail.com*

^{##}*e-mail: mariya.zakharova333@gmail.com*

Study of CD4⁺ T-cell response and T-cell receptor (TCR) specificity is crucial for understanding etiology of immune-mediated diseases and developing targeted therapies. However, solubility, accessibility, and stability of synthetic antigenic peptides used in T-cell assays may be a critical point in such studies. Here we present a T-cell activation reporter system using recombinant proteins containing antigenic epitopes fused with bacterial thioredoxin (trx-peptides) and obtained by bacterial expression. We report that co-incubation of CD4⁺ HA1.7 TCR⁺ reporter Jurkat 76 TRP-cells with CD80⁺ HLA-DRB1*01:01⁺ HeLa-cells or CD4⁺ Ob.1A12 TCR⁺ Jurkat 76 TRP with CD80⁺ HLA-DRB1*15:01⁺ HeLa-cells resulted in activation of reporter Jurkat 76 TPR after addition of recombinant trx-peptide fusion proteins, containing TCR-specific epitopes. Trx-peptides were comparable with corresponding synthetic peptides in their capacity to activate Jurkat 76 TPR. These data demonstrate that thioredoxin as a carrier protein (trx) for antigenic peptides exhibits minimal interference with recognition of MHC-specific peptides by TCRs and consequent T-cell activation. Our findings highlight potential feasibility of trx-peptides as a reagent for assessing the immunogenicity of antigenic fragments.

Keywords: MHC class II, antigen presentation, Jurkat 76 TPR, CD80⁺ HeLa